

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der

Ludwig-Maximilians-Universität München

ehem. komm. Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. G. Plewig

jetziger Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Th. Ruzicka

**Immunhistologie von Nickel-Epikutantestreaktionen  
im Vergleich zu Proben aus Gewebe um revidierte unzensurierte  
Chrom-Kobalt-Molybdän-Hüftendoprothesen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

A n j a   S c h ö b e r l

aus Ingolstadt

Jahr  
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. P. Thomas
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. D. Nowak
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	31.01.08

## GLIEDERUNG

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	S.6
1.1	<u>Nickel und Kobalt in der Historie</u>	S.6
1.2	<u>Alltäglicher Stellenwert von Nickel und Kobalt im Berufs- und Privatleben</u>	S.6
1.3	<u>Mechanismen der Überempfindlichkeitsreaktionen</u>	S.8
1.3.1	<u>Überblick</u>	S.8
1.3.2	<u>Typ-I-Reaktion (Reaktion vom Soforttyp)</u>	S.8
1.3.3	<u>Typ-II-Reaktion</u>	S.9
1.3.4	<u>Typ-III-Reaktion</u>	S.9
1.3.5	<u>Typ-IV-Reaktion</u>	S.10
1.4	<u>Allergische Reaktionen auf Metalimplantate</u>	S.11
1.5	<u>Kontaktekzem bei Nickel- und Chromat-Allergie, induziert durch ein orthopädisches Metallimplantat – ein Fallbericht</u>	S.12
<b>2</b>	<b><u>FRAGESTELLUNG</u></b>	S.13
<b>3</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	S.13
3.1	<u>Patienten</u>	S.14
3.2	<u>Gewebeproben</u>	S.16
3.2.1	<u>Gewinnung der Gewebeproben</u>	S.16
3.2.2	<u>Weiterbearbeitung der Gewebeproben</u>	S.16
3.2.2.1	<u>Einfriertechnik und Gefrierschnitte</u>	S.16
3.2.2.2	<u>Material</u>	S.17
3.2.3	<u>Färbungen</u>	S.17
3.2.3.1	<u>HE-Färbung</u>	S.17
3.2.3.2	<u>AEC-Färbung</u>	S.18
3.2.3.3	<u>Doppelfärbung</u>	S.19
3.2.3.4	<u>Materialien</u>	S.20
3.2.3.5	<u>Herstellung von Puffern und Lösungen</u>	S.22
3.2.3.6	<u>Immunphänotypisierung</u>	S.23
3.3	<u>Kontrollen</u>	S.24
3.3.1	<u>Positivkontrollen</u>	S.24
3.3.2	<u>Negativkontrollen</u>	S.24
3.4	<u>Vorgehensweise und Probleme bei der Etablierung der Färbemethoden</u>	S.25
3.5	<u>Auswertung</u>	S.26
<b>4</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	S.27
4.1	<u>Überblick der Gewebecharakteristika in der HE-Färbung</u>	S.27
4.2	<u>Überblick über die immunhistologische Beurteilung der Gewebeproben</u>	S.28
4.3	<u>T-Zellanwesenheit und Subtypenverteilung</u>	S.29
4.3.1	<u>Gruppe 1</u>	S.29
4.3.2	<u>Gruppe 2</u>	S.30
4.3.3	<u>Gruppe 3</u>	S.31
4.3.4	<u>Fall E2</u>	S.31
4.3.5	<u>Zusammenfassung</u>	S.33
4.4	<u>Präsenz von Makrophagen/Monozyten</u>	S.33

4.4.1 <u>Gruppe 1</u>	S.33
4.4.2 <u>Gruppe 2</u>	S.34
4.4.3 <u>Gruppe 3</u>	S.35
4.4.4 <u>Fall E2</u>	S.35
4.4.5 <u>Zusammenfassung</u>	S.36
4.5 <u>Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und CD62E (auf Endothelzellen)</u>	S.37
4.5.1 <u>Gruppe 1</u>	S.37
4.5.2 <u>Gruppe 2</u>	S.37
4.5.3 <u>Gruppe 3</u>	S.38
4.5.4 <u>Fall E2</u>	S.38
4.5.5 <u>Zusammenfassung</u>	S.38
4.6 <u>Expression der Aktivierungsmarker IL-2R und CD69</u>	S.39
4.6.1 <u>Gruppe 1</u>	S.39
4.6.2 <u>Gruppe 2</u>	S.40
4.6.3 <u>Gruppe 3</u>	S.41
4.6.4 <u>Fall E2</u>	S.41
4.6.5 <u>Zusammenfassung</u>	S.42
4.7 <u>Ausprägung der proliferativen Aktivität im Infiltrat</u>	S.43
4.7.1 <u>Gruppe 1</u>	S.43
4.7.2 <u>Gruppe 2</u>	S.45
4.7.3 <u>Gruppe 3</u>	S.45
4.7.4 <u>Fall E2</u>	S.45
4.7.5 <u>Zusammenfassung</u>	S.47
4.8 <u>Differenzierung in naive CD45RA+ T-Zellen und sensibilisierte CD45RO+ T-Zellen</u>	S.47
4.8.1 <u>Gruppe 1</u>	S.48
4.8.2 <u>Gruppe 2</u>	S.49
4.8.3 <u>Gruppe 3</u>	S.50
4.8.4 <u>Fall E2</u>	S.51
4.8.5 <u>Zusammenfassung</u>	S.51
4.9 <u>Expression des Aktivierungsmarkers CD40 (auf Makrophagen/B-Zellen)</u>	S.52
4.9.1 <u>Gruppe 1</u>	S.52
4.9.2 <u>Gruppe 2</u>	S.53
4.9.3 <u>Gruppe 3</u>	S.53
4.9.4 <u>Fall E2</u>	S.54
4.9.5 <u>Zusammenfassung</u>	S.54
4.10 <u>Nachweis von Ki-67 + T-Zellen mittels Doppelfärbung für A59</u>	S.55
4.11 <u>Nachweis von aktivierten IL-2R + T-Zellen mittels Doppelfärbung für A59</u>	S.56
5 <u>DISKUSSION</u>	S.56
5.1 <u>Mechanismen der Spätyppallergie am Beispiel des Kontaktekzems durch Nickel</u>	S.56
5.1.1 <u>Die Rolle von CD3+/CD4+/CD8+/Memory-Zellen beim allergischen Kontaktekzem</u>	S.57
5.1.2 <u>Die Bedeutung von Adhäsionsmolekülen</u>	S.59
5.1.3 <u>Die Bedeutung von CD69, Interleukin-2 und seinem Rezeptor</u>	S.60
5.1.4 <u>Zellproliferation als möglicher Hinweis auf Antigen-induzierte Aktivierung</u>	S.61

5.1.5	<u>Die Rolle von CD45RA+ und CD45RO+ T-Zellen</u>	S.61
5.1.6	<u>Die Rolle von CD40</u>	S.61
5.1.7	<u>Immunologische Toleranz</u>	S.62
5.2	<u>Metallimplantatunverträglichkeit</u>	S.63
5.2.1	<u>Arten von Endoprothesen</u>	S.63
5.2.2	<u>Physikalische Charakteristika der Metall-Metall-Gleitpaarungen</u>	S.64
5.2.3	<u>Einflussfaktoren für Metallimplantatunverträglichkeit</u>	S.64
5.2.3.1	Immunogene Potenz von Implantatmaterialien	S.64
5.2.3.2	Patienteneigene Faktoren	S.65
5.2.4	<u>Klinische Bilder einer Metallimplantatallergie</u>	S.65
5.2.5	<u>Histologische Ergebnisse</u>	S.66
5.2.6	<u>Aseptische Prothesenlockerung – bisherige Erkenntnisse</u>	S.68
5.3	<u>Ausblick</u>	S.70
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	S.71
7	<u>DANKSAGUNG</u>	S.72
8	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	S.73
9	<u>LEBENS LAUF</u>	S.81

# **1 EINLEITUNG**

## **1.1 Nickel und Kobalt in der Historie**

Bei Nickel und Kobalt handelt es sich um ubiquitär vorkommende Metalle der Gruppe VIIIb des Periodensystems, deren Nutzen der Mensch bereits sehr früh in der Geschichte für sich entdeckt hat. Schon in der Antike wurden nickelhaltige Legierungen zur Herstellung von Waffen verwendet. Bereits vor über 1000 Jahren setzten chinesische Handwerker eine Nickellegierung als sogenanntes „weißes Kupfer“ zur Produktion von Haushaltsgeräten und Kunstgegenständen ein.

1754 wurde Nickel als das 28. Element des Periodensystems durch den schwedischen Chemiker A. F. Cronstedt als eine noch unreine Form entdeckt, 1820 von Berthier als reines Metall isoliert. Die kommerzielle Nutzung fand allerdings erst in den letzten 100 Jahren statt – erstmals 1865 als 3 Cent- Münze in den USA. Im 20. Jahrhundert bis in die 30er Jahre wurde Nickelsulfat für medizinische Zwecke genutzt, so zur Behandlung von Epilepsie, Neuralgien oder Migräne.

Anfang der 30er Jahre wurde Nickel auch erstmalig als Auslöser von Kontaktekzemen identifiziert. Dies geschah bei Arbeiten in der Galvanisierungsindustrie, bei denen unter ungeschütztem Umgang mit Nickelsalzen die sogenannte „Nickelkrätze“ auftrat.

(Barceloux, 1999a)

Kobalt wurde bereits 2000 vor Christus als blau färbendes Agens in der Töpferei wie auch der Glas- und Schmuckherstellung in Ägypten und Persien verwendet und sogar Leonardo da Vinci machte sich diese Eigenschaft in seinen Ölgemälden zu Nutze. Im 18. Jahrhundert gelang dem schwedischen Chemiker George Brandt erstmalig die Isolierung von Kobalt. In den 20er Jahren fand Kobalt schließlich in Form von Wolfram-Kobalt-Legierungen breite industrielle Anwendung, beispielsweise zur Fertigstellung von hitze- und korrosionsstabilen Bohr-/Schneidegeräten und aufgrund seiner magnetischen Eigenschaften in den 80er Jahren auch im Bereich der Elektroindustrie.

In der Medizin wurde Kobalt zur Behandlung von Anämie in den 40er Jahren eingesetzt.

Seit den 60er Jahren ist eine Assoziation von Kobalt mit dem allergischen Kontaktekzem bekannt. Insbesondere fielen charakteristische Kobalt-induzierte Hautveränderungen erstmalig bei Arbeitern in der Metallindustrie auf.

(Barceloux, 1999b).

## **1.2 Alltäglicher Stellenwert von Nickel und Kobalt im Beruf und im Privatleben**

Heutzutage findet Nickel vorwiegend Einsatz in der Herstellung von rostfreiem Stahl, von Münzen, Haushaltsutensilien, Werkzeugen, versilberten bzw. vergoldeten Materialien und Schmuck bzw. ähnlichen Produkten aus Weissgold (10-15% Ni), German Silver (10-15% Ni), chirurgischem Stahl (0,5-30% Ni), Sterling Silver. So ist praktisch für jeden über Gebrauchsgegenstände oder im beruflichen Umfeld Nickelkontakt gegeben (Gawkrödger, 1993) (Barceloux, 1999a) (Kanerva & Förström, 2001).

Kobalt wird verwendet für hitze- und korrosionsstabile Superlegierungen, als Trockenmittel in Farben, als magnetische Legierung im Rahmen der Musik-/Computerindustrie, zur Herstellung von Schneide- und Schleifwerkzeugen (6-30% Co) und als Legierungsbestandteil von Metallimplantaten (25-65% Co in hitzestabilem Stahl, bis zu 65% Co und Vitalliumlegierungen). Oft tritt Kobalt auch als „Verunreinigung“ in Nickelpräparationen auf.

Die „metallischen Werkstoffe für chirurgisch-orthopädische Implantate werden in Teil1-12 der internationalen Norm ISO 5832 beschrieben. Ein Beispiel für eine Co-Cr-Mo-Gusslegierung (gemäß ISO 5832-4) ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Dieses ubiquitäre Vorkommen von Nickel und Kobalt in der alltäglichen Welt erklärt auch, dass relativ oft eine spezifische Überempfindlichkeit im Sinne von Allergie gegenüber Nickel und Kobalt in der Allgemeinbevölkerung gefunden wird. Gemäß Schäfer et al. liegen die Sensibilisierungsraten der Allgemeinbevölkerung gegenüber Nickel bei 13,1% und gegenüber Kobalt bei 2,4% (Schäfer et al., 2001). Die Kontaktallergieraten sind noch höher bei Personen, die eine Epikutantestung zur Abklärung von Hauterkrankungen erhalten. Hier führt Nickel die Hitliste der Kontaktallergene an und auch Kobaltallergie ist im Epikutantest häufig. Positive Epikutantest-Ergebnisse gegenüber beiden Metallen gleichzeitig sind häufig, was eher auf einer Kosensibilisierung zu beruhen scheint als auf einer Kreuzreaktivität. (Hegewald, Uter, Pfahlberg, Geier & Schnuch, 2005) (Garner, 2004).

So leiden entsprechend den Untersuchungsergebnissen des Informationsverbandes Dermatologischer Kliniken (IVDK) und der Deutschen Kontaktallergie Gruppe (DKG) aktuell ca. 7% der Allgemeinbevölkerung unter allergischen Kontaktekzemen (Schnuch, Geier, Lessmann, Uter, Brasch & Frosch, 2004), wobei unter Schulkindern Nickel, Thiomersal und Duftstoffmix, unter älteren Kindern Perubalsam, Neomycin und Lanolin als Hauptauslöser dominieren (Heine, Schnuch, Uter & Worm, 2004)

Außerdem ist entsprechend Untersuchungen der Universität Erlangen-Nürnberg das simultane Auftreten von positiven Reaktionen im Epikutantest gegenüber Nickel, Kobalt und Chromat häufig, vor allem bei Bauarbeitern (Hegewald et al. ,2005).

Zieht man die von Coombs und Gell aufgestellte Klassifizierung krankmachender Überempfindlichkeitsreaktionen heran, so beruht das allergische Kontaktekzem auf einer Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV).

<i>ELEMENT</i>	<i>VORGABE ISO 5832-4 (%)</i>
<i>Chrom Cr</i>	<i>28,50-30,00</i>
<i>Molybdän Mo</i>	<i>4,50-7,00</i>
<i>Nickel</i>	<i>1,00 max.</i>
<i>Eisen Fe</i>	<i>1,00 max.</i>
<i>Kohlenstoff C</i>	<i>0,35 max.</i>
<i>Mangan Mn</i>	<i>1,00 max.</i>
<i>Silizium Si</i>	<i>1,00 max.</i>
<i>Kobalt Co</i>	<i>Rest</i>

Tab. 1.1: Prozentuale Anteile verschiedener Legierungsmetalle in Co-Cr-Mo-Gusslegierungen gemäß ISO 5832-4.

Platz	Allergen	% der Getesteten (n=6346)
1	Nickel(II)-Sulfat	15,4
2	Duftstoffmix	9,0
3	Perubalsam	8,4
4	Kaliumdichromat	6,8
5	Kobalt(II)-Chlorid	6,5
6	Dibromdicyanobutan/2-Phenoxyethanol	5,0
7	Amerchol L-101	5,0
8	Kolophonium	4,8
9	p-Phenylendiamin	4,5
10	Kompositenmix	3,1

Tab. 1.2: „Hitliste der Kontaktallergene“ (Informationsverbund dermatologischer Kliniken IVDK, Datenauswertung vom 1. Halbjahr 2004)

### 1.3 Mechanismen der Überempfindlichkeitsreaktionen

#### 1.3.1 Überblick

Wird körpereigenes Gewebe durch eine überschießende oder inadäquate Antwort des erworbenen Immunsystems geschädigt, so bezeichnet man dies als Überempfindlichkeit oder Hypersensitivität. Nach Coombs und Gell unterscheidet man vier Typen von Überempfindlichkeitsreaktionen. Dabei werden die Typen I – III humoral, d.h. durch Antikörper vermittelt. Typ IV- Reaktionen werden zellulär, d.h. durch T-Lymphozyten, vermittelt und aufgrund der längeren Latenzzeit von mindestens 24 Stunden als „Spätreaktion“ bezeichnet wird.

#### 1.3.2 Typ-I-Reaktion (Reaktion vom Soforttyp)

Bei der Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp (Typ I) stehen nach IgE-Antigen-Kontakt rasch einsetzende Symptome im Vordergrund. Klinische Bilder sind allergisches Asthma, allergische Konjunktivitis, Rhinitis allergica, allergische Urtikaria, Angioödem, anaphylaktischer Schock. Pathogenetisch ist sie zurückzuführen auf die Freisetzung verschiedener biologisch aktiver Mediatoren aus Mastzellen und Basophilen. Das frei werdende Histamin bewirkt in Minuten eine Vasodilatation und Exsudation, neu synthetisierte Lipidmediatoren/Leukotriene wie LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> und Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF führen innerhalb von Stunden zu Zellinfiltration, Entzündung und Bronchokonstriktion. Dies geschieht infolge Quervernetzung von bereits vorhandenen, an hochaffinen Fc $\epsilon$ -Rezeptoren-I auf der Oberfläche von Mastzellen bzw. Basophilen gebundenen IgE-Antikörpern durch lösliche Antigene in sensibilisierten Geweben bei zweimaliger Antigenexposition. Voraussetzung für solche allergischen Reaktionen ist also die bei erstmaligem Antigenkontakt stattfindende Bildung spezifischer IgE-Antikörper gegen in der Regel häufig vorkommende, aber generell harmlose Antigene, die dann als Allergene bezeichnet werden.

(Keller, 1994, 239-241)



(Roitt, 1994, 312-315)  
(Roitt, Brostoff & Male, 1995, 268)  
(Janeway & Travers, 1997, 435-437)

### **1.3.3 Typ-II-Reaktion**

Bei der Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ II handelt es sich um eine zytotoxische Immunreaktion. Sie wird durch IgG- und IgM-Antikörper vermittelt, welche gegen antigene auf Zelloberflächen gerichtet sind. Die Opsonisation dieser Zellen durch Bindung der Antikörper an die Zellmembranantigene kann nun eine Komplement-vermittelte Lyse bewirken oder auch die Elimination der Zielzellen durch antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität einleiten. Bei letzterem Prozess werden Effektorzellen wie Makrophagen, Neutrophile oder Eosinophile, die Fc-Rezeptoren für das entsprechende Immunglobulin exprimieren, durch die Bindung desselben aktiviert. Somit ist dann die Fähigkeit zur Phagozytose, Bakterizidie und letztlich Zerstörung der Zielzelle gefördert.

Beispiele für die Typ-II-Reaktion sind Transfusionszwischenfälle, Morbus haemolyticus neonatorum, autoimmunhämolytische Anämien, hyperakute Transplantatabstoßung.

(Keller, 1994, 255-261)  
(Roitt, 1994, 321-325)  
(Roitt, Brostoff & Male, 1995, 288-298)  
(Janeway & Travers, 1997, 451-452)

### **1.3.4 Typ-III-Reaktion**

Die Typ-III-Reaktion wird durch Immunkomplexe getragen, die durch die Aggregation von meist komplementbindenden Antikörpern vom IgM-/IgG-Typ und löslichem extrazellulärem Antigen zustandekommen. Mit Krankheitserscheinungen muss vor allem bei qualitativ bzw. quantitativ inadäquater humoraler Immunantwort und Persistieren von Antigenen in der Zirkulation gerechnet werden. Lagern sich die Immunkomplexe, deren Elimination nicht bewerkstelligt werden konnte, in Gefäßen oder im Gewebe ab, so wird Komplement durch die Bindung an die C-bindenden Antikörper aktiviert und die hierdurch gebildeten Faktoren C3a und C5a setzen aus Mastzellen, Basophilen und Blutplättchen Mediatoren frei, die eine gesteigerte Gefäßpermeabilität bewirken. Des Weiteren locken die chemotaktischen Faktoren C3a, C5a, C5b, C6, C7 etc. polymorphkernige Leukozyten an, die die Immunkomplexe phagozytieren und beim anschließenden Zerfall lysosomale Enzyme freisetzen. Insbesondere neutrale Proteinase wie Kathepsine, Kollagenase, Elastase sind hierbei für die Schädigung körpereigener Strukturen z.B. der Basalmembran verantwortlich. Das somit frei liegende Kollagen der Basalmembran, aber auch die Interaktion von Thrombozyten mit den Immunkomplexen über die Fc-Rezeptoren der Blutplättchen, führt zur Plättchenaggregation und Mikrothrombenbildung, wobei wiederum durch freiwerdende gefäßaktive Amine z.B. Chlorpheniramin, Methysergid die Gefäßpermeabilität weiter gesteigert und Exsudation von Flüssigkeit und Proteinen gefördert wird.

Als beispielhaft gelten die Serumkrankheit, Immunvaskulitiden, Farmerlunge oder Immunkomplex-Glomerulonephritis.

(Keller, 1994, 261-272)

(Roitt, 1994, Essential Immunology, 8th edition, 325-331)  
(Roitt, Brostoff & Male, 1995, 299-309)  
(Janeway & Travers, 1997, 452-453)

### **1.3.5 Typ-IV-Reaktion**

Die Typ-IV-Reaktion wird auch als zelluläre Überempfindlichkeit oder Allergie vom verzögerten Typ (Spättyp) bezeichnet. In der englischsprachigen Literatur steht hierfür der Begriff „delayed type hypersensitivity“ (DTH). Im Vordergrund stehen sensibilisierte T-Lymphozyten, die bei erneutem Antigen („Allergen“-) Kontakt erst nach mehrstündiger bis mehrtägiger Latenz klinische Symptome verursachen.

Typische klinische Manifestationsformen sind das allergische Kontaktekzem oder Arzneimittelreaktionen (teils in Form hämatogener Kontaktekzeme). Von manchen Autoren wird die Tuberkulinreaktion als Sonderform einer Spätreaktion getrennt behandelt („Typ V-Reaktion“) und gemeinsam mit granulomatösen Reaktionen diskutiert.

Für das allergische Kontaktekzem ist die zentrale Rolle von T-Lymphozyten sowohl durch histologische Untersuchungen als auch durch In-vitro-Modelle der T-Zellaktivierung untersucht worden. Als klinischer Testansatz zur Identifizierung möglicher Auslöser bei den betroffenen Patienten wird der Epikutantest eingesetzt. Hier werden in standardisierter Konzentration sozusagen als epikutaner Provokationstest Auslöser der Typ IV (Kontaktallergie-)Reaktion in der Regel 48h auf der Haut appliziert. Über histologische Analyse aus entsprechenden Ekzem-Testreaktionen sowie über In-vitro-T-Zell-Aktivierungsexperimente, beispielsweise durch Nickel, sind wesentliche Pathomechanismen identifiziert worden.

Bei der Entstehung des allergischen Kontaktekzems unterscheidet man die Sensibilisierungsphase von der Auslösephase.

Während der Sensibilisierungsphase wird ein Kontaktallergen als Antigen von antigenpräsentierenden Zellen/Langerhans-Zellen gebunden, prozessiert und den Lymphozyten des drainierenden Lymphknotens präsentiert. Gedächtniszellen werden gebildet. In der Auslösephase führt der erneute Kontakt der Haut mit dem Allergen zur Auslösung der eigentlichen inflammatorischen Reaktion durch entsprechend aktivierte dermale Gedächtniszellen.

Pathogenetisch lässt sich die Spättyp-Überempfindlichkeit in drei Phasen unterteilen: In der ersten Phase steht die Präsentation von an MHC-Klasse II-Moleküle gebundenen Fremdanitigen durch antigenpräsentierende Zellen – in der Haut sind dies Langerhans-Zellen, Makrophagen und Endothelzellen. Dies ist natürlich verbunden mit der Aktivierung der T-Zellen, wobei IL-2 als Produkt aktivierter T-Lymphozyten die T-Zell-Proliferation steigert, die IL-2-Synthese von CD4+ - T-Zellen fördert und außerdem die Sekretion insbesondere durch TH1-Zellen von TNF- $\alpha$  in der Anfangsphase, von TNF- $\beta$  im weiteren Verlauf und von INF- $\gamma$  induziert. Während TNF- $\alpha$  und - $\beta$  eine lokale Gewebsschädigung und eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen auf den lokalen Blutgefäßen bewirken, bedingt INF- $\gamma$  neben der funktionellen Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen, vor allem von Makrophagen, auch eine gesteigerte Expression von MHC-Klasse II-Molekülen sowie eine Unterstützung der Effektorzellen und eine erhöhte Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Die TH1-Produkte IL-3 und GM-CSF fördern zudem die Bildung von Makrophagen aus Stammzellen des Knochenmarks.

Es schließt sich nun in der zweiten Phase Zytokin-reguliert die Aktivierung und Rekrutierung weiterer Zellen, nämlich von Blutleukozyten an. Dabei werden in bekannter Abfolge nacheinander bestimmte Adhäsionsmoleküle durch die Endothelzellen exprimiert, was den zeitlichen Ablauf und die Qualität der Einwanderung der Leukozyten ins Gewebe steuert. Zunächst wird ELAM-1, das ausschließlich Neutrophile bindet, exprimiert, dann ICAM-1, der Ligand für LFA-1 auf der Oberfläche von Leukozyten und schließlich VCAM-1, der Bindungspartner für VLA-4 auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Die Endothelzellen locken zudem Leukozyten durch sezernierte chemotaktisch wirkende Stoffe wie IL-8 und auf Monozyten einwirkendes chemotaktisches Protein (CMP-1) an. TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  unterstützen hierbei ebenso die Rekrutierung, indem sie eine Retraktion der Endothelzellen und Veränderungen an der Basalmembran bewirken. Im Gewebe selbst haben ebenfalls Adhäsionsmoleküle, insbesondere  $\beta$ 1-Integrine, eine wesentliche Bedeutung für die Interaktion zwischen eingewanderten und ortsständigen Zellen.

Abschließend erfolgt nun die Beseitigung des Fremdantigens durch aktivierte Effektorzellen – Neutrophile, Monozyten, aber auch CD8+ - T-Killerzellen erfüllen diese Funktion. Ist jedoch eine vollständige Elimination nicht möglich, so kommt es infolge andauernder Fibroblastenproliferation und Kollagensynthese zu einer Fibrose und der Ausbildung von Granulomen.

(Keller, 1994, 274-277)

(Roitt, 1994, 331-333)

(Roitt, Brostoff & Male, 1995, 310-320)

(Janeway & Travers, 1997, 455)

#### **1.4 Allergische Reaktionen auf Metallimplantate**

Metallimplantate betreffen nicht nur klassische Bereiche wie Osteosynthese oder Gelenkersatz, sondern auch zahnärztliche und HNO-ärztliche Implantate sowie Stents zur Gefäßlumenenerhaltung. Operationsbedingt sind zunächst Entzündungsvorgänge um das Implantat zu erwarten, eine spätere Einheilung ist aber die Regel. Dass auch Interaktionen mit dem Immunsystem stattfinden ist schon in den 60er Jahren anhand der Abriebpartikel-induzierten Fremdkörperreaktion um Gelenkendoprothesen beschrieben worden (Willert & Semlitsch, 1996). In Assoziation mit metallhaltigen Osteosynthesematerialien wurden Wundheilungsstörungen, lokale oder ausgedehnte Ekzeme, erhöhte Sensibilisierungsraten, Osteomyelitiden sowie fehlende Frakturheilung bei Patienten mit Metall- (Nickel-, Kobalt- oder Chrom-)Allergie beschrieben.

(Kubba, Taylor & Marks, 1981) (Samitz & Katz, 1975) (Rakoski, Mayenburg, Düngemann & Borelli, 1986) (Gawkrödger, 1993) (Waterman & Schrik, 1985) (Duchna, Nowack, Merget, Muhr und Schultze-Werninghaus, 1998) (Hayashi, Kaneko, Kawachi & Saida, 1999) (Gordon, Buxton, McLaren and Aldridge, 1996) (Köster, Vieluf, Kiehn, Sommerauer, Kähler, Baldus, Meinertz & Hamm, 2000).

In den letzten Jahren sind auch mehrere Veröffentlichungen erschienen, in denen Patienten mit Lockerung bzw. nicht durch Infekt erklärbarer Komplikationen bei Metall-Metall-Hüftgelenkersatz auffällige periimplantäre Gewebereaktionen hatten (Baur, Hönle, Willert & Schuh, 2005). So waren in den entsprechenden Präparaten aus Revisionsoperationen Hinweise auf lymphozytär geprägte Entzündungen

beschrieben worden (Willert, Buchhorn, Fayazzi & Lohmann, 2000) (Willert, Buchhorn, Fayazzi & Lohmann, 2001) (Doorn, Mirra, Campbell & Amstutz, 1996).

Dementsprechend werden derzeit – nach Ausschluss klassischer Ursachen (wie Infekt oder mechanisches Versagen) – auch Überempfindlichkeitsreaktionen als Auslöser für aseptische Lockerung oder rezidivierende Ergussbildung diskutiert.

Noch sind aber viele Fragen offen. So ist unbekannt, in welchem Ausmaß der Nachweis von kutaner Kontaktallergie im Epikutantest Rückschlüsse auf periimplantäres Gewebe erlaubt. Es sind Auslöserschwellen für Hautreaktionen bei Metall-allergischen Personen bekannt, so beispielsweise „kritische“ Nickelfreisetzungsmengen“ aus Gebrauchsgegenständen mit längeren Hautkontakt. Dies hat zu der europäischen „Nickel-Direktive“ geführt, in der für solche Gegenstände (beispielsweise Ohrringe) eine maximale Nickelfreisetzung von 0,5µg Nickel/cm<sup>2</sup>/Woche festgelegt wurde.

Bei Patienten mit Metallimplantaten, speziell künstlichen Gelenken, wurde schon in den 80er Jahren erhöhte Kobalt- und Chrom-Spiegel im Blut und Urin beschrieben. Auch eine erhöhte Nickelausscheidung wurde gefunden (Merritt & Brown, 1996) (Kreibich, Moran, Delves, Owen & Pinder, 1996) (Urban, Jacobs, Tomlinson, Gavrilovic, Black & Peoc'h, 2000) (Coleman, Herrington & Scales, 1973).

Allerdings gibt es trotz der bekannten Korrosion von Metallen im Körper noch keine entsprechende Stellenwertabklärung für Allergie auslösende Metallkonzentrationen in periimplantären Geweben. Natürlich ist hier auch der Einfluss proinflammatorischer Signale und Toleranz-induzierender Mechanismen anzunehmen. Auch hierüber ist noch kaum etwas bekannt.

Der typische Verlauf einer Metallimplantatallergie wird aus der folgenden Kasuistik deutlich.

### **1.5 Kontaktekzem bei Nickel- und Chromat-Allergie, induziert durch ein orthopädisches Metallimplantat – ein Fallbericht**

Im Zusammenhang mit allergischen Reaktionen bzw. Sensibilisierungen gegenüber Nickel und Kobalt wurden in den letzten Jahren auch zunehmend Metallimplantate als mögliche Auslöser diskutiert.

Die Abteilung für Dermatologie des Finnish Institute of Occupational Health, Tapeliuksenkatu 41aA, FIN-00250 Helsinki, Helsinki Medical Centre, Helsinki, Finnland berichtet über einen 35jährigen Patienten, bei dem anamnestisch bisher keine Metallallergie bestand. Der Patient entwickelte einen Monat nach operativer Versorgung einer mehrfragmentigen Sprunggelenksfraktur rechts mit Metallplatten und Schrauben juckende, schuppige, vesikulopapuläre Hautveränderungen an mehreren Fingern beider Hände mit palmarer und akraler Betonung, die sich in den nächsten Monaten verschlimmerten.

Die Konsultation eines Dermatologen 6 Monate nach dem dem Fall zugrundeliegenden Unfallereignis ergab einen Epikutantest, der entsprechend den Anforderungen der ICDRG durchgeführt wurde und positiv war für Nickelsulfat ( +++ ), Chromat ( + ), Kobalt ( ?+ ), Budesonid ( ++ ) und 4-tert-butylphenol-formaldehyd-Harz ( + ).

Auf medizinischen Rat hin wurden die Metallimplantate entfernt und entsprechend 8 Schrauben und eine Platte mit Hilfe der energy-dispersive X-ray-Analyse untersucht. Die Schraube und die Platte enthielten 62,0 - 63,7% Eisen, 17,4 – 18,0% Chrom, 14,1 – 14,9% Nickel, 1,5 – 1,8% Molybdän und 0,2 – 0,6% Silikon.

Aufgrund dieser dargelegten Ergebnisse und Befunde wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass sowohl die Sensibilisierung gegen Metalle als auch das Handekzem durch das orthopädische Implantat hervorgerufen worden waren (Kanerva & Förström, 2001).

Die Problematik der Metallimplantatallergie wird gerade in der Zukunft außerordentlich an Bedeutung gewinnen angesichts der permanenten Ausdehnung des Metallimplantateinsatzes auf die verschiedensten Fachbereiche der Medizin – und ebenso angesichts des sich durchsetzenden Modetrends von Ohrsteckern, Piercings und diversen kosmetischen und ästhetischen Zielen dienenden metallenen Implantaten.

## **2 FRAGESTELLUNG**

Die Arbeit beschäftigt sich damit Charakteristika des Nickel-induzierten Kontaktekzems über Immunhistologie von Hautproben zu beurteilen. Dies geschieht im Vergleich mit Biopsien aus reaktionsloser Haut im Nickel-Epikutantestfeld nicht allergischer Personen. Weiterhin wurden Gewebeproben aus der Umgebung von CrCOMo-basierten, nicht-zementierten Hüftendoprothesen im Rahmen von Revisionsoperationen zur Beurteilung erhalten.

Dabei wurde versucht, das Zellinfiltrat zu beurteilen und die Expression von Funktions-/Aktivierungsantigenen zu untersuchen. Die Hautproben zu Nickel-induzierten Kontaktekzemen wurden in einer frühen Phase gewonnen (72h nach Provokationsbeginn im Rahmen des Epikutantests). Die periimplantären Proben stammen aus Bereichen, die bereits über Jahre den Komponenten von CrCoMo-basierten Hüftendoprothesen exponiert waren. Wegen verschiedenen Beschwerden und vor allem Lockerung (ohne Infekt bzw. mechanisches Versagen) war hier eine Revisions-/Wechseloperation vorgenommen worden. Leider war bei diesen Patienten keine Epikutantestung durchgeführt worden.

In der Arbeit wurden folgende Schwerpunkte gesetzt:

- Aufschlüsselung des Zellinfiltrats (T-,B- Zellen, Monozyten/Makrophagen) und weitere Aufschlüsselung des T-Zell-Infiltrats
- Analyse von Aktivierungs-/Funktionsmarkern
- Beurteilung von Adhäsionsmolekülen
- Untersuchung der Zellproliferation im Infiltrat als Hinweis für entzündungsassoziierte Aktivierung

## **3 MATERIAL UND METHODEN**

In dieser Arbeit wurden Stanzbiopsien aus Epikutantest (ECT)-Arealen von Patienten mit Ekzemreaktionen im Nickelfeld zur Untersuchung herangezogen (Gruppe 1). Bei diesen Patienten bestand auch ein anamnestischer Hinweis auf Nickelallergie.

Zum Vergleich dienten Stanzbiopsien aus klinisch reaktionslosen Nickel- ECT-Arealen, d.h. aus Epikutantestfeldern ohne klinische Reaktion von Patienten ohne anamnestisch eruierbare Nickelkontaktallergie (Gruppe 2). Diese Vergleichsgruppe wurde herangezogen zur Analyse der Frage, ob die beobachteten Phänomene bei den Patienten mit Nickelallergie auf die spezifische allergische Entzündungsreaktion

zurückzuführen sind bzw. ob sie bereits durch unspezifische toxische Effekte des Nickelmetalls zu erklären sind.

Des Weiteren wurden uns über die Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der Technischen Universität München Gewebeproben zur Verfügung gestellt, die bei Patienten mit unzementierter Chrom-Cobalt-Molybdän-basierter Hüftendoprothese während einer Revisionsoperation aus periimplantärem Gewebe entnommen worden waren (Gruppe 3).

### **3.1 Patienten**

#### **GRUPPE 1**

Die erste Patientengruppe bestand aus 5 Patienten, bei denen im Standardepikutantest eine Ekzemreaktion im Nickeltestfeld auftrat und dementsprechend eine Nickelkontaktallergie diagnostiziert wurde. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Die Nummerierung der Patienten richtet sich nach der zeitlichen Reihenfolge des Eintreffens der Gewebeproben im Labor und ist wegen zwischenzeitlich anderer eingegangener Materialien diskontinuierlich.

<b>Patient</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Ekzem durch nickelhaltige Materialien</b>	<b>ECT-Ergebnis im Nickel-Testfeld</b>
A 58	w	22	Ja	+
A 59	w	36	Ja	+
A 67	w	68	Ja	+
A 69	w	66	Ja	++
A 89	w	55	Ja	++

Tab. 3.1.: Klinische Daten zu Patienten mit Nickelkontaktallergie (Gruppe 1);  
Abkürzungen: w = weiblich; m = männlich; ECT = Epikutantest; 0 = keine Reaktion; + = positive allergische Reaktion: Erythem, Infiltrat, keine Papeln; ++ = Erythem, Infiltrat, Papeln, Bläschen; +++ = positive allergische Reaktion: dicht stehende Papeln, Infiltrat, konfluierende Bläschen;

#### **GRUPPE 2**

Die zweite Patientengruppe setzte sich ebenso aus 5 Patienten zusammen, bei denen im Standardepikutantest keine Ekzemreaktion im Nickeltestfeld auftrat, die somit keine Nickelunverträglichkeit aufwiesen. Die entsprechenden Patientencharakteristika sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Die Nummerierung der Patienten richtet sich hier ebenso nach der zeitlichen Reihenfolge des Eintreffens der Gewebeproben im Labor und ist wegen zwischenzeitlich anderer eingegangener Materialien diskontinuierlich.

<b>Patient</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Ekzem durch nickelhaltige Materialien</b>	<b>ECT-Ergebnis im Nickel-Testfeld</b>
A 52	w	79	Nein	0
A 56	w	22	Nein	0
A 60	w	36	Nein	0
A 66	w	64	Nein	0
A 68	w	68	Nein	0

Tab. 3.2.: Klinische Daten zu Patienten ohne Nickelkontaktallergie (Gruppe2); Abkürzungen siehe Tab. 3.1.

### **GRUPPE 3**

Die dritte Patientengruppe (Tab. 3.3) bestand aus 6 Personen, bei denen eine Revisionsoperation einer Hüft-Totalendoprothese (TEP) durchgeführt worden war. Alle 6 Personen hatten eine Endoprothesenlockerung sowie unterschiedliche Zusatzbeschwerden bei zementfreier Chrom-Kobalt-Molybdän (CrCoMo) basierter Endoprothetik. Die angestrebte Epikutantestung wurde leider bei fünf der Patienten nicht durchgeführt. Der zuletzt in Tabelle 3.3 aufgeführte Patient E2 hatte bei einem niedergelassenen Dermatologen einen Epikutantest erhalten, hier jedoch keine Reaktion auf Metalle (Nickel, Chrom, Kobalt) gezeigt.

Patient	Ge- schlecht	Alter	Beschwerden in Zusammenhang mit der Hüftendoprothetik	Art des Metall- implantats
20/03	M	52	1)Pfannenlockerung rechts 2)Schmerzen in der re Hüfte seit 2-3 Monaten, v.a.bei Belastung, mit Ausstrahlung ins re Kniegelenk 3)Deutliche Bewegungseinschränkung re Hüfte	Zementlose Hüft-TEP (Typ ESKA)
32/03	M	44	1)Stiellockerung re 2)Schmerzen in der re Hüfte seit > 6 Monaten, v.a. bei Belastung mit Ruhe-/Anlaufschmerz (Gehstrecke <10 min) 3)Deutliche Bewegungseinschränkung re Hüfte	Zementlose Hüft-TEP (Typ ESKA)
38/03	M	32	1)Stiellockerung 2)Schmerzen in der li Hüfte seit > 1 Jahr, v.a. bei Belastung mit Limitierung der Gehstrecke	Zementlose Hüft-TEP (Typ ESKA)
39/03	M	53	1)Pfannenlockerung 2)Schmerzen in der re Hüfte seit 3-4 Monaten mit Nacht-/Ruhe-/Stauchungsschmerz und Limitierung der Gehstrecke 3)Bewegungseinschränkung re Hüfte	Zementlose Hüft-TEP (Typ ESKA)
43/03	W	71	1)Lockerung Hüft-TEP li 2)Schmerzen li Hüfte 3)Bewegungseinschränkung li Hüfte	Zementlose Hüft-TEP (Typ ESKA)
E2	M	60	1)Lockerung Hüft-TEP re 2)Schmerzen re Hüfte, v.a. bei Belastung 3)Bewegungseinschränkung re Hüfte 4) Lokales Serom	Zementlose Hüft-TEP (Fa. Centerpulse-Zimmer)

Tab. 3.3.: Klinische Daten zu Patienten mit Revisionsoperation einer unzementierten Hüft-Totalendoprothese (Hüft-TEP) aus jeweils Cr Co Mo basierten Materialien; Abkürzungen siehe Tab. 3.1.

## **3.2 Gewebeproben**

### **3.2.1 Gewinnung der Gewebeproben**

Es wurden zum einen Hautproben in Form von Stanzbiopsien mit einem Durchmesser von 3 mm gewonnen aus:

- Epikutantestarealen nach 48stündiger Provokation mit Nickelsulfat. Hierbei wurde im Rahmen eines Routine – ECT Nickel-II-Sulfat ( $\text{NiSO}_4$ ) in Vaseline für 48 Stunden mittels einer Finn Chamber aus Aluminium und einem Pflaster auf gesunde Hautareale am Rücken aufgebracht. Dabei zeigten die Patienten der Gruppe 1 in Entsprechung zu dem anamnestischen Verdacht auf Nickelallergie ein akutes Kontaktekzem in diesem Areal (Ergebnisse des ECT siehe Tabelle). Aus diesen Ekzembereichen wurden nun 24 Stunden später und somit 72 Stunden nach Provokationsbeginn entsprechende Stanzbiopsien entnommen.

- klinisch reizlosen Epikutantestarealen bei Patienten der Gruppe 2.

Des Weiteren wurde periimplantäres Gewebe im Rahmen einer Revisionsoperation bei 5 Patienten an der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der Technischen Universität München gewonnen und für eine immunhistologische Beurteilung zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurde uns über die chirurgische Abteilung des Klinikums Dachau von einem Patienten (Kodierung E2, Tab 3.3) periimplantäres Gewebe aus der Umgebung einer wegen Lockerung revidierten Metall-Metall (CrCoMo-basierten) Hüft-TEP zugeschickt.

Alle beteiligten Patienten waren volljährig und hatten nach einem ausführlichen Aufklärungsgespräch und mindestens 24 Stunden Bedenkzeit der Gewebeentnahme zugestimmt. Der durch die Hautbiopsien entstandene kutane Defekt wurde jeweils mit einer Einzelknopfnah und einem Pflaster versorgt.

### **3.2.2 Weiterbearbeitung der Proben**

#### **3.2.2.1 Einfriertechnik und Gefrierschnitte**

Nach der Gewinnung von Stanzbiopsien sowie nach Entnahme des periimplantären Gewebes wurde dieses in mit wenig Einfriermedium (Tissue freezing Medium) gefüllte Plastischälchen (Cryomold Tissue Tek Intermediate Specimen Molds) eingebettet, anschließend die Schälchen bis zum Rand mit dem Einfriermedium aufgefüllt und daraufhin in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. In Alufolie eingewickelt und in Gefiertüten verpackt wurde das Gewebe dann bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Gefrierschnitte wurden mit dem Kryostat der Kryostatserie HM 500 der Firma Microm Heidelberg mit einer Schnittdicke von  $6\mu\text{m}$  angefertigt, auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (25mm x 75 mm) aufgebracht (Super Frost Plus) und im Anschluss über Nacht luftgetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte 10 Minuten in Aceton fixiert, danach 30 Minuten luftgetrocknet und die einzelnen Objektträger Rücken an Rücken in Alufolie eingewickelt. Abschließend erfolgte das Einfrieren der Schnitte bei  $-20^\circ\text{C}$ .

Die Anfertigung von Gefrierschnitten zeigte sich zum Teil problematisch, weil die Qualität der Schnitte gewebeabhängig unterschiedlich ausfiel. Die einzelnen periimplantären Gewebe enthielten meist kollagenes Bindegewebe, aber auch teilweise Muskel- und Knorpelgewebe und wiesen so teilweise eine unterschiedliche Tendenz auf, während des Schneidevorganges zu zerreißen oder beim Aufziehen der Gewebe auf den Objektträger zum Umknicken der Schnittränder zu führen. Stark



metallhaltiges Gewebe (E2), das bereits makroskopisch sichtbare Metallablagerungen aufwies, ließ sich auch nach versuchsweise mehrmaliger Abänderung des Fixationsvorgangs nicht auf den üblicherweise verwendeten Objektträgern Super Frost Plus fixieren. So wurden für „E2“ unbeschichtete „Objektträger Mattrand“ der Firma Menzel benutzt, wobei die restliche Vorgehensweise gleich blieb.

### **3.2.2.2 Material**

Bei der Gewebekonservierung und –verarbeitung wurden verwendet:

- Objektträger geschnitten/Mattrand (Menzel-Gläser, 021102)
- Objektträger Super Frost Plus (Menzel-Gläser, J 1800 AMNZ)
- Einfrierschälchen
- Tissue Freezing Medium (Jung, 020108926)
- Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Germany, 1.09242)

### **3.2.3 Färbungen**

#### **3.2.3.1 HE-Färbung**

Von jeder Gewebeprobe wurde zur Übersicht die klassische HE – Färbung als Standardfärbung der konventionellen Histologie entsprechend dem nachfolgendem Färbeprotokoll durchgeführt. Bei dieser sogenannten Succadenfärbung mit den beiden Farbstoffen Eosin und Hämalaun wird das Cytoplasma durch die Anlagerung des negativ geladenen Eosins an positiv geladene Gewebskomponenten, insbesondere an Proteine, rot gefärbt, während die Zellkerne durch die Bindung des positiv geladenen Hämalauns an die sauren Bestandteile der DNS eine blaue Färbung erhalten.

1. Frische Schnitte 30 Minuten an der Luft trocknen lassen bzw. tiefgefrorene Schnitte 30 Minuten auftauen
2. 10 Minuten Acetonfixierung
3. 30 Minuten Lufttrocknen
4. Schnitte 5 Minuten in aqua dest. wässern
5. Ca.4 Minuten Hämalaunlösung
6. Mindestens 30 Minuten fließend bläuen, d.h. mit Leitungswasser spülen
7. Ca. 4 Minuten Eosin 0,1% (in aqua dest.; mit 1 Tropfen Eisessig ca. 14 Tage haltbar)
8. Anschließend jeweils einmal kurz durchziehen in – aqua dest.
9. – 70% Alkohol
- 10.– 96% Alkohol
- 11.– 96% Alkohol
- 12.30 Sekunden – 1 Minute 100% Alkohol
- 13.3 Minuten 100% Alkohol
- 14.15 Minuten Roticlear I
- 15.Mindestens 15 Minuten Roticlear II
- 16.Eindecken in Kaisers Glycerin

### 3.2.3.2 AEC-Färbung

Als immunhistochemische Färbung zur Identifizierung, Charakterisierung und Differenzierung des vorhandenen Zellinfiltrats wurde die Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Färbung angewandt.

Allgemein werden im Rahmen immunhistochemischer Färbungen zunächst monoklonale Antikörper auf den Schnitt aufgetragen, sogenannte Primärantikörper, welche an die nachzuweisenden Antigene des Gewebes binden. Anschließend wird ein sogenannter Brückenantikörper aufgebracht, der sich an den Fc-Teil des Primärantikörpers anlagert und nun technikabhängig auf unterschiedliche Art und Weise mit Hilfe eines Farbstoffs erkenntlich gemacht werden kann. Somit entspricht die hierdurch entstandene Anfärbung der Antigenverteilung im Gewebe.

Die ABC-Methode basiert auf der Ausbildung des sogenannten Avidin-Biotin-Komplexes durch Anlagerung von 4 oder in der Regel weniger Molekülen Biotin an das Glykoprotein Avidin. Der verwendete Brückenantikörper ist im Bereich des Fc-Teils mit Biotin konjugiert und kann dadurch die freien Bindungsstellen des Avidin-Biotin-Komplexes binden. Der verwendete rote Farbstoff AEC lagert sich an das Enzym an, wobei letztlich die Intensität der Färbung von der Menge des nachzuweisenden Antigens abhängig ist. Zur besseren histologischen Beurteilung hat sich auch hier eine Kerngegenfärbung mit Hämalaun als sinnvoll herausgestellt.

Für die ABC-Färbung hat sich folgende Vorgehensweise bewährt:

1. Frische Schnitte 30 Minuten an der Luft trocknen lassen bzw. tiefgefrorene Schnitte 30 Minuten auftauen
2. 10 Minuten Acetonfixierung
3. 30 Minuten Lufttrocknen
4. 5 Minuten PBS
5. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase 30 Minuten 500µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in ca. 200 ml PBS
6. 5 Minuten PBS
7. Zum Abblocken unspezifischer Antikörper 20 Minuten – max. 1 Stunde jeweils 150 µl FKS (Fetales Kälberserum) bzw. Pferdeserum 1 : 20 (verdünnt in PBS) pro Objektträger
8. FKS abklopfen
9. 1 Stunde jeweils 150 µl des 1.Antikörpers in entsprechender Verdünnung (in PBS) pro Objektträger
10. Dreimaliges Spülen mit PBS + 1% Tween
11. 1 Stunde jeweils 100 µl des 2.Antikörpers (Brücken – Antikörper) in entsprechender Verdünnung ( in PBS ) pro Objektträger
12. Dreimaliges Spülen mit PBS + 1% Tween
13. Max. 30 Minuten jeweils 100 µl des 3.Antikörpers (Avidin – Biotin – Komplex = ABC aus 10 µl des Reagenz A + 10µl des Reagenz B in 1ml 30% AB-Humanserum mit 30minütiger Reifungszeit) pro Objektträger
14. Dreimaliges Spülen mit PBS + 1% Tween
15. Ca. 10 Minuten Einwirken der Färbelösung aus einer in 10 ml DMSO oder DMFO gelösten Tablette 3-Amino-9-Ethylcarbazole (= AEC) + 80 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 200 ml Natriumacetatpuffer
16. 5 Minuten in Leitungswasser
17. Ca. 4 Minuten mit Hämalaun gegenfärben
18. 10 Minuten fließend wässern mit Leitungswasser
19. Eindecken in Kaisers Glycerin

### 3.2.3.3 Doppelfärbung

Zur weiterführenden Charakterisierung der Zellen wurde ein ausgewähltes Präparat (A59) zudem einer Doppelfärbung als Kombination von ABC-AEC-Färbung und APAAP- Färbung unterzogen, deren Durchführung an zwei aufeinanderfolgenden Tagen entsprechend dem nachfolgenden Protokoll erfolgte.

Doppelfärbungen sind vor allem zum gleichzeitigen Nachweis zweier Antigene einer Zelle, d.h. zum Nachweis einer Koexpression von Antigenen hilfreich. So wurde im Rahmen dieser Arbeit zum Nachweis proliferierender T-Zellen die Koexpression von CD3 und Ki67 sowie zum Nachweis aktivierter T-Zellen die Koexpression von CD3 und IL2-R mittels Doppelfärbung mit den Farbstoffen AEC und Fast Blue sichtbar gemacht.

#### 1. TAG

1. Frische Schnitte 30 Minuten an der Luft trocknen lassen bzw. tiefgefrorene Schnitte 30 Minuten Auftauen
2. 10 Minuten Acetonfixierung
3. 30 Minuten Lufttrocknen
4. 5 Minuten PBS
5. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase 30 Minuten 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 200 ml PBS
6. 5 Minuten PBS
7. Zum Abblocken unspezifischer Antikörper 20 Minuten – max. 1 Stunde jeweils 150 µl FKS bzw. Pferdeserum 1 : 20 (verdünnt in PBS) pro Objektträger
8. FKS abklopfen
9. 1 Stunde jeweils 150 µl des 1. Antikörpers in entsprechender Verdünnung (in PBS ) pro Objektträger
10. Dreimaliges Spülen mit PBS + 1% Tween
11. 1 Stunde jeweils 100 µl des 2. Antikörpers (Brücken- Antikörper) in entsprechender Verdünnung (in PBS) pro Objektträger
12. Dreimaliges Spülen mit PBS + 1% Tween
13. Max 30 Minuten jeweils 100 µl des 3. Antikörpers (ABC aus 10µl des Reagenz A + 10µl des Reagenz B in 1 ml 30% AB – Humanserum mit 30 minütiger Reifungszeit) pro Objektträger
14. Dreimaliges Spülen mit PBS + 1% Tween
15. Ca. 10 Minuten Färbelösung aus einer in 10 ml DMSO oder DMFO gelösten Tablette AEC + 80 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 200 ml Natriumacetatpuffer
16. 5 Minuten in Leitungswasser
17. Über Nacht in mit aqua dest. verdünntem PBS (1 : 10) im Kühlschrank lagern

#### 2. TAG

1. 10 – 20 Minuten TRIS – Puffer
2. 1 Stunde jeweils 150 µl des 1. Antikörper in entsprechender Verdünnung (in Dilution – Puffer) pro Objektträger
3. Dreimaliges Spülen mit TRIS + 1% Tween
4. 20 Minuten jeweils 150 µl des 2. Antikörpers pro Objektträger

(Rabbit - anti – Mouse- AK aus

250 µl R-a-M

+ 625µl AB – Humanserum

+ 4125µl PBS)

5. Dreimaliges Spülen mit TRIS + 1% Tween

6. 20 Minuten jeweils 150 µl des 3. Antikörpers pro Objektträger

(APAAP - AK aus

100 µl APAAP

+ 4900µl PBS)

7. Dreimaliges Spülen mit TRIS + 1% Tween

8. Schritte 4 – 7 jeweils noch zweimal wiederholen, jedoch mit einer Inkubationszeit von nur je 10 Minuten

9. Färbelösung filtrieren, auf die Schnitte auftropfen und für 10 Minuten inkubieren

( Färbelösung aus

- 20 mg Naphthol-AS-MX-phosphat, gelöst in 2 ml  
N,N-Dimethylformamid (DMF)

+ 98 ml TRIS

-> Aliquotieren in 5 ml – Portionen (können bei  
-20 ° C für längere Zeit aufbewahrt werden)

-> Direkt vor dem Gebrauch zu jedem 5 ml – Aliquot  
1 mg Fast – Blue – BB – Salz sowie 5 Tropfen 5  
mM Levamisollösung)

10.2 Minuten spülen in TRIS + 1% Tween

11.2 Minuten aqua dest.

12. Eindecken in Kaisers Glycerin

### **3.2.3.4 Materialien**

Für die beschriebenen Färbemethoden wurden folgende Materialien verwendet:

- AB-Serum, Biotech GmbH, P 302501

- AEC = 3-Amino-9-Ethylcarbazol, Sigma

- Steinheim, Germany, A 6926

- APAAP 2, Dako, Z 25910

- APAAP 3, Dako, D 065101

- Alkohol, Ethanol absolut, Apotheke Klinikum Innenstadt,

- Dilution - Puffer (DAK Antibody Diluent with Background Reducing Components),  
Dako, S 3022

- DMFO = Dimethylformamid, Sigma, D 8654

- DMSO = Dimethylsulfoxid, Merck, 9678

- Eosin G, Merck, 1.15935

- Fast Blue BB-Salz, Sigma, F 3378

- FKS, Biochrom AG Berlin, Germany, S 0115

- Saure Hämalunlösung nach P. Mayer, Apotheke Klinikum Innenstadt

- Levamisollösung, Sigma, L-9756

- Naphthol-AS-MX-phosphat, Sigma, N 4875

- Natriumacetat-Puffer

210 ml 0,1 N Essigsäure 96 %, Merck

790 ml 0,1 N Na Ac-Lsg. ( 3,61 g Natriumacetat-  
trihydrat ad 1 l a.d.), Merck, 6267

- PBS-Puffer, Merck, 6586

5,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Merck, 4873

1,85 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Merck, 6404

45 g NaCl auf 5 l aqua dest.

- Pferd-anti-Maus-AK, Vector Laboratories Burlingame, P 0311

- Roticlear, Roth Karlsruhe, Germany, A 538.1

- Tween 20, Merck, 822184

- Tris, Merck, 8382

- Wasserstoffperoxid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %, Merck, 1.07209

### **Verbrauchsmaterialien**

- 1,5 ml Safelock-Tubes, Eppendorf

- 15 ml-Röhrchen, Greiner

- Cryomold Tissue Tek Intermediate Specimen Molds Volumen 15 mm x 15 mm, Miles Inc. Diagnostics

- Deckgläser 24 mm x 24 mm, Menzel-Gläser

- Faltenfilter Durchmesser 240 mm, Schleicher und Schuell

- Mikroliterpipetten ( 0,1 – 1000 µl ), Eppendorf

- Pipettenspitzen ( 10 µl, 100µl, 1000 µl ), Eppendorf

### **Geräte**

- Abzug, Köttermann

- Elektronische Präzisionswaage, Kern

- Gefrierschrank (-20°C), Miele

- Kryostat-Mikrotom CM 3050S, Leica

- Kühlschrank mit Gefriereinheit, Bosch

- Lichtmikroskop, Zeiss

- Magnetrührer IKA-Combimag RCH mit Heizplatte, Janke und Kunkel

pH-Meter PHM220, Radiometer

- Pipetboy Saugpipette, IBS Integra Biosciences

- Vortex-Schüttelgerät, Bender und Hobein AG

- Waage R300, Sauter

- Wasserbad SW-20C, Julabo

### **Primärer AK, Konzentr., Hersteller, Art. Nr., Subklasse**

- CD 3, 1:1000, Dako, M 756, IgG<sub>1</sub>, κ

- CD 4, 1:50, Dako, M 716, IgG<sub>1</sub>, κ

- CD 8, 1:200, Dako, M 707, IgG<sub>1</sub>, κ

- CD 14, 1:40, Dako, M 0825, IgG<sub>2a</sub>, κ

- CD 19, 1:300, Dako, M 740, IgG<sub>1</sub>, κ

- CD 20, 1:200, Dako, M 755, IgG<sub>2a</sub>, κ

- CD 40, 1:300, Immunotech, 1374, IgG<sub>1</sub>

- CD 45 RA, 1:100, Dako, M 0754, IgG<sub>1</sub>, κ

- CD 45 RO, 1:600, Dako, M 0742, IgG<sub>2a</sub>, κ

- CD 62E, 1:500, BD Pharmingen, 33361A, IgG<sub>1</sub>, κ

- CD 68, 1:1000, Dako, M 0814, IgG<sub>1</sub>, κ

- CD 69, 1:150, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, MHCD 6900

- ICAM-1, 1:2500, Alexis, 805-016-C050, IgG<sub>1</sub>

- Ki-67, 1:150, Dako, M7240, IgG<sub>1</sub>
- IL-2R, 1:150, Dako, M0731, IgG<sub>1</sub>, κ
- Ig-G1, 1:100, Dianova-Immunotech Marseille, France, REF 0280
- IgG2a, 1:100, Dako, X 0943

### **3.2.3.5 Herstellung von Puffern und Lösungen**

#### **- PBS-Puffer ( Phosphate buffered saline ):**

Zur Herstellung von einem Liter 10-fach konzentrierter PBS-Stammlösung mit dem pH 7,2 werden 10,3 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,7 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 90 g NaCl in einem Liter aqua dest. gelöst. Einen Liter PBS-Gebrauchslösung erhält man durch Verdünnung von 100 ml Stammlösung mit 900 ml destilliertem Wasser.

#### **- TRIS-Puffer:**

##### *- 10-fach konzentrierte TRIS-Stammlösung:*

60,55g Trishydroxymethylaminomethanbase werden in 1l aqua dest. gelöst und anschließend der pH durch Titrieren mit Salzsäure unter pH-Meter-Kontrolle auf 7,6 eingestellt.

##### *- 9%-Kochsalz-Stammlösung:*

87,66g NaCl werden in einem Liter aqua dest. gelöst.

##### *- TRIS-Gebrauchslösung:*

Zur Herstellung von einem Liter TRIS-Gebrauchslösung werden 100 ml Stammlösung, 100 ml NaCl-Lösung und 800 ml aqua dest. vermischt.

#### **- Natrium-Acetat-Puffer:**

0,1 normale Essigsäurelösung wird durch Verdünnen von 5,71 ml 96% Essigsäure in einem Liter Aqua dest. hergestellt. Die Pufferstammlösung erhält man durch Lösen von 13,61g Natrium-Acetat-Trihydrat in einem Liter destilliertem Wasser.

Ein Liter Gebrauchslösung entsteht nun durch Zusammengießen von 210 ml der Essigsäurelösung und 790 ml der Pufferstammlösung.

#### **- Eosin-Färbelösung:**

Nach Herstellen von 0,1% Eosinlösung durch Verdünnung mit aqua dest. werden zu 200 ml zwei Tropfen 96% Essigsäure hinzugesetzt und die so entstandene Lösung gründlich vermischt und zweimalig filtriert.

#### **- AEC-Färbelösung:**

Unter dem Abzug wird eine Tablette AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazole) in 10 ml DMSO gelöst. Die Färbelösung wird durch Zugabe von 200 ml Natrium-Acetat-Gebrauchspuffer und anschließender Filtration hergestellt.

#### **- Fast-Blue-Färbelösung:**

##### *- Grundlösung:*

20 mg Naphthol-AS-MX-Phosphat werden in 98 ml TRIS-Puffer gelöst und mit 2 ml N, N-Dimethylformamid vermischt. Die Grundlösung kann zu 5 ml Aliquots abgefüllt und bei -20°C eingefroren und aufbewahrt werden.

##### *-Gebrauchslösung:*

Unmittelbar vor dem Färbevorgang wird ein Aliquot mit 1 mg Fast Blue BB-Salz und 5 Tropfen 5 mM Levamisol versetzt, mit Hilfe des Vortex-Gerätes gründlich vermischt und schließlich zweimalig filtriert.

### **3.2.3.6 Immunphänotypisierung**

Zur Charakterisierung der T-Zellen wurden Antikörper gegen CD3, CD4 und CD8 verwendet. CD3 ist ein dem T-Zell-Antigen-Rezeptor (TCR) assoziiertes Membranprotein, das zur Signalübermittlung ins Zellinnere nach T-Zellerkennung durch den TCR verantwortlich ist. CD3 gilt als hochspezifisch für T-Zellen aller Reifungsstufen. Die T-Zellen wurden darüber hinaus immunhistochemisch klassifiziert in CD4+ T-Helfer-Zellen und CD8+ zytotoxische/Suppressor-T-Zellen. CD4 kann jedoch auch durch manche Monozyten und Makrophagen exprimiert werden sowie beispielsweise durch neoplastische Zellen kutaner T-Zell-Lymphome und HTLV-I+ T-Zell-Leukämien/Lymphome (Dako, Specification Sheet, Anti-Human CD3) (Dako, Specification Sheet, Anti-Human CD4) (Dako, Specification Sheet, Anti-Human CD8).

Die B-Zellen wurden anhand des Oberflächenantigens CD20 identifiziert.

CD20 wird von den meisten B-Zellen exprimiert, der Antikörper gegen CD 20 reagiert weder mit neoplastischen T-Zellen noch mit anderen hämatopoetischen oder nicht-lymphoiden Zellen, jedoch mit den Reed-Sternberg-Zellen bei M. Hodgkin, v.a. beim lymphozytenreichen Typ (Dako, Specification Sheet, Anti-Human CD20).

Als charakteristisches Zellmembran-Antigen der Monozyten/Makrophagen wurde CD14 immunhistochemisch nachgewiesen. CD14 markiert zu mehr als 95% Monozyten, aber auch Granulozyten im peripheren Blut wie im Knochenmark, ebenso wie perivaskuläre Makrophagen, Langerhans-Zellen der Haut, follikuläre dendritische Zellen, Sinushistiozyten, Epithelzellen, Makrophagen der Milz, Alveolarmakrophagen, Spindelzellen der Niere und verstärkt Zellen einiger akuter myeloischer Leukämien v.a. vom FAB-Typ M4,M5 (Dako, Specification Sheet, Anti-Human CD14).

Zur Darstellung des immunologischen Gedächtnisses wurden Antikörper gegen CD45RA für naive T-Zellen, die noch keinen Kontakt zum Antigen hatten sowie gegen CD45R0 für sogenannte Gedächtniszellen, die bereits durch vorausgegangenen Antigenkontakt sensibilisiert wurden, eingesetzt. Im Übrigen ist während der Aktivierungsphase von ruhenden CD45RA+ T-Zellen ein Isotypenwechsel von CD45RA zu CD45R0 beschrieben. Der anti-CD45R0-Antikörper markiert neben reifen aktivierten T-Zellen allerdings auch eine z.T. CD4+, z.T. CD8+ Subpopulation von ruhenden T-Zellen sowie einige Zellen myelomonozytären Ursprungs, selten B-Zellen. Der anti-CD45RA-Antikörper bindet hingegen neben ruhenden T-Zellen typischerweise auch B-Zellen, was jedoch in dieser Arbeit ein eher zu vernachlässigender Effekt sein dürfte aufgrund der in der Regel geringen B-Zelldichte im periimplantären Infiltrat (Dako, Detection of B- and T-cells in Routine Pathology, 2nd edition).

Ferner wurde der Aktivierungszustand der T-Zellen durch den Nachweis von Interleukin-2-Rezeptor bzw. CD25 näher charakterisiert, ein Oberflächenprotein, das in geringerer Dichte auch auf aktivierten B-Zellen und auf weniger als 5% der lymphoiden Zellen des peripheren Blutes zu finden ist (Dako, Specification Sheet, Anti-Human CD25).

Als der am frühesten induzierbare Aktivierungsmarker auf T-Zellen, aber auch auf natürlichen Killerzellen und B-Zellen, wurde das integrale Membranprotein CD69 nachgewiesen, welches zu einer erhöhten Genexpression von IL-2 und INF- $\gamma$ , einer verstärkten Expression von CD25 und letztlich zu einer IL-2 abhängigen T-Zell-Proliferation führt (Cebrian et al., 1988) (Testi et al., 1989).

Als klassischer Proliferationsmarker diene Ki-67, ein Kernprotein, welches in allen aktiven Phasen des Zellzyklus ( G<sub>1</sub>- , S- , G<sub>2</sub>- , M-Phase ) vorhanden ist, jedoch in ruhenden Zellen der G<sub>0</sub>-Phase nicht nachgewiesen werden kann (Dako, Specification Sheet, Anti-Human Ki67).

Als weiterer Proliferations- bzw. Aktivierungsmarker findet sich CD40 auf B-Zellen aller Reifungsstufen, ebenso auf interdigitierenden Zellen, follikulären dendritischen Zellen, Endothelzellen, Basalepithelzellen, und Karzinomzellen und bindet an aktivierte T-Zellen, was die B-Zellproliferation und Immunglobulinsekretion induziert (Immunotech, Data Sheet, Monoclonal Antibody CD 40).

Darüber hinaus wurden als Migrationsmarker die Adhäsionsmoleküle CD62E (E-Selektin, endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 ELAM-1) sowie ICAM-1 (CD54) auf durch Zytokine stimuliertem Endothel, in geringen Mengen auch auf unstimuliertem Endothel angefärbt (BD Pharmingen, Technical Data Sheet, Antibody to CD 62E) (Alexis, Product Data Sheet, Monoclonal Antibody to CD 54 (human)).

### **3.3 Kontrollen**

#### **3.3.1 Positivkontrollen**

Als stichprobenartige Positivkontrollen wurden beispielsweise spezifische Antikörper durch die Inkubation und Färbung von Geweben mit erwartungsgemäß hohem Gehalt an entsprechendem Antigen qualitativ überprüft. So wurden beispielsweise Schnitte von Tonsillae pharyngeae durch die Inkubation mit anti-CD-19- bzw. anti-CD20-Antikörpern angefärbt zur Qualitätskontrolle dieser Antikörper.

#### **3.3.2 Negativkontrollen**

Als Negativkontrollen wurden erstens bei jedem Färbevorgang und für jedes einzelne zu färbende Gewebe mindestens ein Schnitt mitbearbeitet, der jedoch anstatt mit dem Primärkörper nur mit der entsprechenden Pufferlösung inkubiert wurde, d.h. mit PBS bei der ABC-AEC-Färbung bzw. mit TRIS-Puffer am 2.Tag der Doppelfärbung. Diese Art von Kontrollen dienten vor allem dazu unspezifische Hintergrundaktivität erkenntlich zu machen, bedingt durch u.a. hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Gewebsproteinen und Antikörpermolekülen, durch endogene Enzymaktivitäten insbesondere der endogenen Peroxidase im Hämoglobin der Erythrozyten, im Myoglobin der Muskelzellen, in den Zytochromen der Granulozyten und der Monozyten etc. Somit konnte bei der Auswertung durch den Vergleich von mit Primärantikörper inkubierten Gewebeschnitten mit derartigen Kontrollen unspezifisch angefärbtes Gewebe abgegrenzt werden von aufgrund von spezifischer Antigen-Antikörper-Reaktion gefärbten Zellen.

Zweitens wurden alle Gewebe mit IgG1 und IgG2a als Primärantikörper inkubiert, um auch hierdurch spezifische von unspezifischen Bindungen mit demselben Antikörper-Isotyp auszuschließen.

Unspezifische Färbungen können ebenso durch die Bindung des Primärantikörpers an Fc-Rezeptoren des Gewebes, z.B. an der Oberfläche von Monozyten entstehen. Zur Blockierung derartiger unspezifischer Bindungen dient nun die Inkubation mit FKS bzw. entsprechend den Anleitungen von Vector Laboratories Pferdeserum in den Einzelfärbungen bzw. mit AB-Serum in den Doppelfärbungen. Die zur Kontrolle mitgeführten Isotypenkontrollen zeigen entsprechend nach erfolgreicher Blockierung keine Anfärbung.



Bei den Doppelfärbungen wurden neben der Inkubation mit Pufferlösung auch jeweils Isotypkontrollen separat für beide eingesetzten Primärantikörper durchgeführt. Außerdem wurde eine Kreuzreaktivität der zwei eingesetzten Brückenantikörper durch folgende Kontrollmaßnahme ausgeschlossen: Die ABC-Färbung wurde entsprechend dem Protokoll bis einschließlich der Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex vollzogen. Jedoch wurde anschließend sowohl auf den Färbevorgang mit AEC als auch auf die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper verzichtet und sofort der APAAP-Brückenantikörper aufgetragen und schließlich im Weiteren entsprechend dem Protokoll vorgegangen. Auf diese Weise sollte eine Färbung durch Bindung des zweiten Brückenantikörpers an den ersten Primärantikörper ausgeschlossen werden.

### **3.4 Vorgehensweise und Probleme bei der Etablierung der Färbemethoden**

Insgesamt basieren die Methoden dieser Doktorarbeit zum einen auf den Angaben der Handbücher I und II immunchemischer Färbemethoden von Dako sowie auf „Immunenzymatische Doppelfärbungen, eine praktische Anleitung“ von Dako als auch auf persönlicher Beobachtung und Austestung der Methoden durch Variation von Lufttrocknungszeiten der auf Objektträger aufgezogenen Gewebeschnitte, von Inkubationszeiten der verwendeten Antikörper, von Färbungszeiten und von Konzentrationen insbesondere der Primärantikörper bei der AEC-Färbung, welche zum Teil entsprechend den Vorschlägen der jeweiligen Firma eingesetzt wurden.

Im Rahmen der Doppelfärbung wurde die Anzahl der Durchläufe beim an die APAAP-Färbung angelehnten 2. Teil der Doppelfärbung variiert, versuchsweise der am 1. Tag verwendete Antikörper mit dem am 2. Tag eingesetzten ausgetauscht, verschiedene Farbstoffe z.B. NBT/BCIP getestet, versuchsweise mit Hämalaun gegengefärbt, verschiedene Antikörperkombinationen verwendet.

Dabei hat sich insgesamt als sinnvoll erwiesen, wie bereits unter 4.2.1 angeführt, für stark metallhaltiges Gewebe unbeschichtete Objektträger zu verwenden, da sich die mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger Super Frost Plus diesbezüglich als unbrauchbar zeigten. Ferner hat die Vorgehensweise entsprechend den dargelegten Färbeprotokollen zu den besten Ergebnissen geführt, wobei die gefärbten Präparate nicht überfärbt erschienen mit ansonsten hieraus resultierenden Problemen bei der Differenzierung der einzelnen Zellen und Abschätzung der angefärbten Zellzahl. Die Hintergrundfärbung konnte minimal gehalten werden und die unspezifische Anfärbung von Präparaten minimiert werden, sodass eine bestmögliche Vergleichbarkeit und Auswertbarkeit der Präparate gegeben war. Zur Blockierung unspezifischer Antikörper wurde versuchsweise fetales Kälberserum wie auch Pferdeserum verwendet, was jeweils zu vergleichbar guten Ergebnissen führte.

Bei der Doppelfärbung hat sich neben der AEC- Rotfärbung der blaue Farbstoff Fast Blue BB-Salz als günstig herauskristallisiert, wobei auf eine Gegenfärbung mit dem violett-blauem Hämalaun aus auswertungstechnischen Gründen verzichtet wurde. Sinnvollerweise wurde außerdem versucht hierbei einen cytosolischen Antikörper mit einem Zellmembranantikörper zu kombinieren, um eine exakte Differenzierung der Zellen sowie eine genaue Auswertung und Interpretation bzw. Charakterisierung derselben zu garantieren. Des weiteren wurden schönere und leichter differenzier- und auswertbare Ergebnisse erzielt, wenn am 1. Tag der Doppelfärbung der Antikörper verwendet wurde, dessen Zielantigen im Vergleich zum Kombinationsantikörper in höherer Konzentration in dem Gewebe vorhanden war.

Darüber hinaus hat sich als günstig herausgestellt an den Rändern des Deckglases der in Gelatine eingedeckten Präparate nach 2-3 Tagen Lufttrocknen farblosen Nagellack aufzutragen, um das Deckglas somit luftdicht abzuschließen und hierdurch das Eindringen von Luftblasen zu vermeiden. Letzteres behindert sowohl die Auswertung als auch das Fotografieren der Präparate. Ferner scheint eine baldige Auswertung nach der Färbung der Gewebe sinnvoll, da ein potentiell Abblässen der gefärbten Schnitte nach längerer Lagerung einkalkuliert werden sollte.

### **3.5 Auswertung**

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde entsprechend den Empfehlungen von Herrn Dr. Strobl vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität München vorgegangen. Da diese Arbeit auf einer Analyse von Biopsiematerialien basiert, ist in den einzelnen Gruppen nur eine relativ geringe Fallzahl von Patienten vorhanden, was eine statistische Auswertung nur beschränkt ermöglicht.

Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Mikroskop bei 500facher Vergrößerung betrachtet und die Anzahl der gefärbten Zellen pro Gesichtsfeld registriert. Es wurden mindestens zwei Schnitte pro gefärbtem Antikörper evaluiert. Bei den Einzelfärbungen galten solche Zellen als positiv, deren Zellkern eindeutig erkenntlich war und die einen eindeutigen rot – bräunlichen Farbton aufwiesen, bei den Doppelfärbungen solche mit sichtbarem Zellkern und mit sowohl rötlich-bräunlicher als auch blauer Anfärbung. Es wurden alle unter 4.3.2 beschriebenen Negativkontrollen als Vergleich herangezogen, um tatsächlich die gefärbten Zellen ausfindig zu machen, deren Färbung mit größter Wahrscheinlichkeit auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion und somit auf dem Vorhandensein des immunhistochemisch nachzuweisenden Antigens beruht. Außerdem wurde die angefärbte Zellzahl in Beziehung gesetzt zum Gesamtgehalt des Gewebes an Zellen innerhalb des betrachteten Zellkollektivs, um die Differenzen im Zellgehalt des inhomogenen Gewebeguts in gewisser Weise auszugleichen. Dabei wurden bei jeder Färbung drei Gesichtsfelder beurteilt und repräsentative Bereiche innerhalb der Schnitte herangezogen. Zur Wahrung der Objektivität wurden die Schnitte durch zwei unabhängige Untersucher zu unterschiedlichen Zeitpunkten evaluiert.

Zunächst wurden anhand der HE-Färbungen die histologischen Charakteristika des Gewebes beurteilt. Anschließend wurden mit Hilfe eines 100 Quadranten-Zählrasters alle dargestellten Zellen mit sichtbarem Kern in einem repräsentativem Ausschnitt des jeweiligen gefärbten Schnitts unter 500facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und deren relativer Anteil in Prozent errechnet durch Bildung des Quotienten Anzahl der gefärbten Zellen / Gesamtzahl an Zellen und Multiplikation mit 100. Dieser Vorgang wurde an zwei weiteren Gesichtsfeldern und von einem zweiten unabhängigen Untersucher zu einem anderen Zeitpunkt wiederholt. Dann wurde der Mittelwert aus den erhaltenen Prozentwerten errechnet und gerundet und schließlich der arithmetische Mittelwert aller Ergebnisse einer Färbeserie angegeben.

Für die Marker ICAM-1 und E-Selektin konnte aufgrund der praktisch ausschließlichen Expression auf Endothelien keine quantitative Auswertung stattfinden und nur rein deskriptiv vorgegangen werden.

Problematisch zeigte sich bei der Auswertung die Tatsache, dass Gegenstand der Untersuchungen dieser Doktorarbeit zum Teil ein Gewebegut ist aus kollagenem

Bindegewebe mit insgesamt unterschiedlichem Zellgehalt. Ferner erwies sich die ebenso durch die Gewebheterogenität begründete unterschiedliche Schnittqualität als schwierig, da zum Teil schnittbedingte Geweberisse und allgemein Schnittränder und Gewebeüberlappungen rein mechanisch Färbelösung zurückhielten. Es wurde in derartigen Fällen nur von diesen Artefakten nicht betroffenes Gewebe beurteilt. Ausgewählte Resultate wurden anschließend mit Hilfe des Mikroskops Axioskop 2 von Zeiss und der Kamera Sony, AVT-Horn, MC-3255, 3 CCD Color Video Camera fotografisch in unterschiedlichen Vergrößerungen dokumentiert

## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 Überblick der Gewebecharakteristika in der HE-Färbung**

Zunächst wurden sowohl die Haut-Stanzbiopsien als auch die periimplantären Gewebeproben in der HE-Färbung beurteilt. Wir danken hier Herrn Dr. Flaig, Abteilung für Histologie an der Dermatologischen Klinik für seine Beratung.

#### **GRUPPE 1**

Es handelt sich hier um die fünf Stanzbiopsien aus Nickel-Epikutantestarealen, bei denen eine Ekzemreaktion aufgetreten war.

In der Gruppe 1, d.h. bei den Patienten mit Nickelkontaktallergie, fiel bei der histologischen Begutachtung der HE-Färbungen eine fokale lymphozytäre Exozytose und Spongiose in der Epidermis mit dermalen lymphohistiozytären Infiltraten auf mit vereinzelt bis zahlreichen eosinophilen Granulozyten.

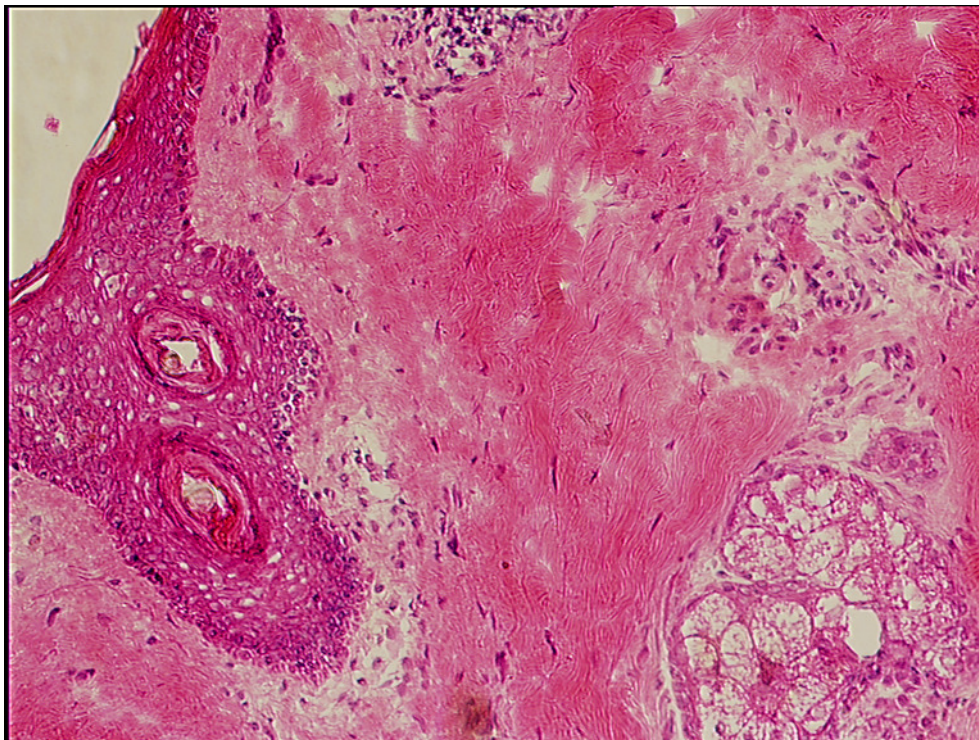


Bild 1: Repräsentative HE-Färbung bei einem Patienten mit Nickelallergie (A59, Vergrößerung 100-fach);

#### **GRUPPE 2**

Es handelt sich hier um die fünf Stanzbiopsien aus Nickel-Epikutantestarealen, bei denen keine Ekzemreaktion aufgetreten war

In der Gruppe 2, d.h. bei den Patienten ohne Nickelkontaktallergie, zeigte sich stets eine unauffällige Epidermis mit in der Dermis vereinzelt Makrophagen und Lymphozyten perivaskulär.

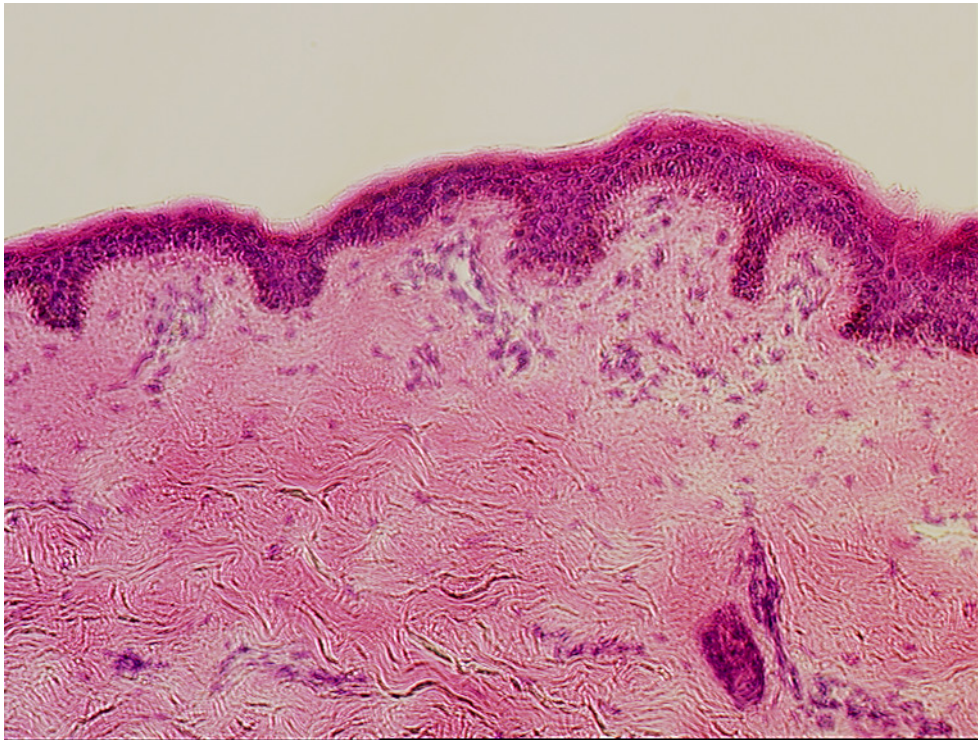


Bild 2: Repräsentative HE-Färbung bei einem Patienten ohne Nickelallergie (A60, 100-fache Vergrößerung)

### **GRUPPE 3**

Hier sind die sechs periimplantären Gewebe aufgeführt, die bei der Revisionsoperation CrCoMo-basierter Hüft-Totalendoprothesen erhalten wurden. In der Gruppe 3 fand sich kollagenes Bindegewebe mit einem chronisch entzündlichen lymphohistiozytären Zellinfiltrat und vereinzelter Ablagerung von Metallpartikeln bzw. massiver bereits makroskopisch sichtbarer Ablagerung/Aggregation von Metallpartikeln bei Proben von Patient E2.

Es folgt eine tabellarische Darstellung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen sowie eine Veranschaulichung derselben durch Grafiken und Fotografien.

## **4.2 Überblick über die immunhistologische Beurteilung der Gewebeproben**

Die immunhistologische Beurteilung der Gewebeproben wurde durchgeführt zu:

- Anwesenheit von T-, B-Lymphozyten und Monozyten / Makrophagen (Antikörper gegen CD3, CD4, CD8, CD20, CD14)
- Expression der Adhäsionsmoleküle (Antikörper gegen ICAM-1, CD62E)
- Expression der Aktivierungsmarker (Antikörper gegen IL-2R, CD69, CD40)
- Ausprägung der proliferativen Aktivität im Infiltrat (Antikörper gegen Ki67)
- Verhältnis von naiven zu Antigen-präexponierten T-Zellen (Antikörper gegen CD45RA, CD45RO)



Es ist hervorzuheben, dass pro Antikörper jeweils die Gesichtsfelder mit dem maximalen Gehalt an gefärbten Zellen ausgezählt wurden. Außerdem wurden konsekutive Schnitte für die Auswertung herangezogen. Es wird jeweils der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen am Zellinfiltrat angegeben, d.h. an der Gesamtmenge der im jeweiligen Gesichtsfeld ausgezählten Zellzahl, so dass generell auch das deutlich stärkere zelluläre Infiltrat in Gruppe 1 im Vergleich zu Gruppe 2 betont werden muss. Weiterhin fiel in Gruppe 3 auch auf, dass einige Patienten deutliche T-Zellinfiltrate aufwiesen – speziell die Proben E2.

Anhand der begrenzten Fallzahlen können zwar keine statistischen Beurteilungen, aber Tendenzen aufgezeigt werden. Dies ist im Folgenden genauer ausgeführt.

### **4.3 T-Zell-Anwesenheit und Subtypenverteilung**

#### **4.3.1 GRUPPE 1**

In Tabelle 5.1 ist der prozentuale Anteil der jeweils angefärbten Zellen an der Gesamtmenge der im jeweiligen Gesichtsfeld ausgezählten Zellzahl dargestellt. Bei den fünf Proben der Gruppe 1 fiel bereits im Überblick das lymphozytär dominierte Zellinfiltrat des Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzems auf.

<b>Patient</b>	<b>CD3</b>	<b>CD4</b>	<b>CD8</b>	<b>CD20</b>
A 58	78%	56%	26%	10%
A 59	41%	32%	22%	19%
A 67	85%	93%	87%	35%
A 69	33%	87%	84%	12%
A 89	88%	70%	26%	12%

<b>Mittelwert</b>	65%	67%	49%	18%
<b>Min / Max</b>	33% / 88%	32% / 93%	22% / 87%	10% / 35%

Tab. 4.1 : Prozentualer Anteil von Gesamt-T-Zellfärbung (CD3) sowie CD4+ und CD8+ bzw. CD20+(B-)Zellen am Gesamtzellgehalt in Gewebeproben aus Ni-ECT-Arealen mit Ekzemreaktion von Patienten mit Nickelkontaktallergie; Abkürzungen: Min = Minimalwert; Max = Maximalwert

In allen gefärbten Gewebeschnitten war ein meist dichtes T-Zellinfiltrat nachzuweisen. Durchschnittlich erwiesen sich 65% der Zellen im Infiltrat als CD3+, bei A89 88%, bei A69 nur 33%.

Dabei waren die CD4+ Zellen mit durchschnittlich 67% deutlich mehr als die CD8+ Zellen mit durchschnittlich 49%.

Die B-Zellen hingegen waren deutlich geringer vorhanden. Durchschnittlich waren 18% CD 20+ Zellen nachweisbar.

**Fazit:** Beim Nickel-induzierten allergischem Kontaktekzem scheint ein CD3+ T-Zellinfiltrat vorzuherrschen, das sich zu einem größeren Teil aus CD4+ T-Helferzellen und zu einem kleinen Teil aus CD8+ zytotoxischen T-Zellen zusammensetzt, während CD20+ B-Zellen nur in geringem Maße nachzuweisen sind.

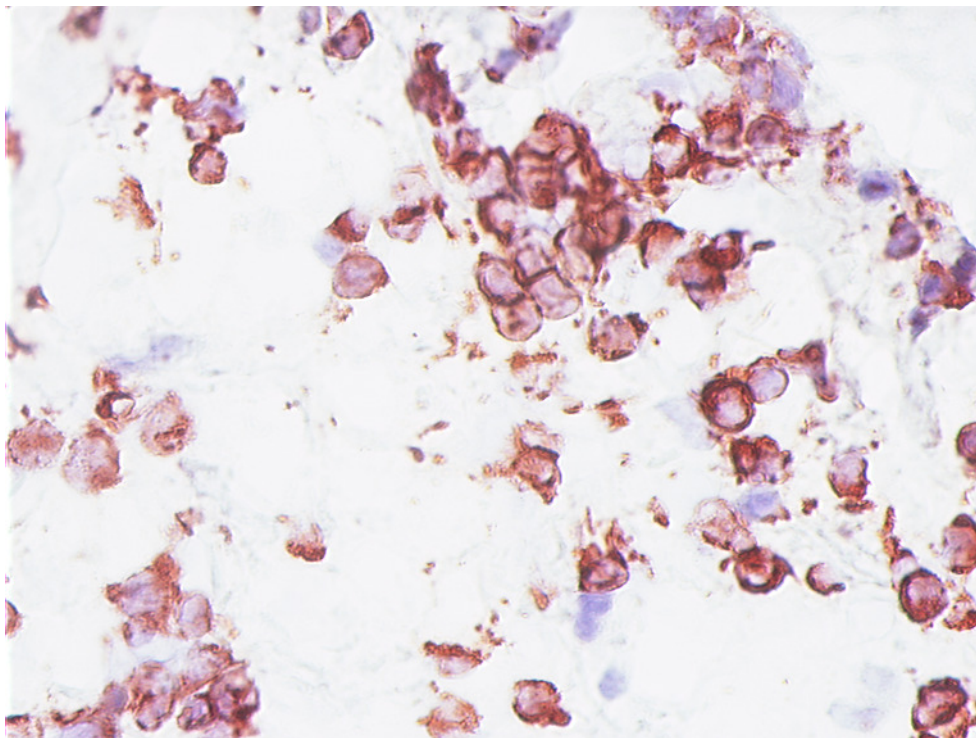


Bild 3: Immunhistologische Darstellung von CD3+ Zellen innerhalb des dermalen Infiltrats bei einem Patienten (A89) mit Nickelallergie; AEC-Färbung; Ak: anti-CD3, Chromogen: AEC; Vergrößerung 400-fach;

#### 4.3.2 GRUPPE 2

Tabelle 5.2 zeigt die Resultate der immunhistochemischen Färbungen zur Charakterisierung des lymphozytären Zellinfiltrats in Ni-ECT-Gewebeproben ohne Ekzemreaktion bei Patienten ohne Nickelkontaktallergie. Es ist jeweils der prozentuale Anteil der jeweils angefärbten Zellen an der Gesamtmenge der im jeweiligen Gesichtsfeld ausgezählten Zellzahl dargestellt.

Patient	CD3	CD4	CD8	CD20
A 52	24%	5%	2%	0%
A 56	27%	41%	10%	5%
A 60	10%	13%	14%	3%
A 66	12%	24%	17%	7%
A 68	21%	55%	24%	34%

<b>Mittelwert</b>	19%	28%	13%	10%
<b>Min / Max</b>	10% / 27%	5% / 55%	2% / 24%	0% / 34%

Tab. 4.2: Prozentualer Anteil von Gesamt-T-Zellfärbung (CD3) sowie CD4+ und CD8+ bzw. CD20+(B-)Zellen am Gesamtzellgehalt in Ni-ECT-Gewebeproben ohne Ekzemreaktion bei Patienten ohne Nickelkontaktallergie;

Es waren in allen Fällen T-Lymphozyten nachweisbar, durchschnittlich 19%, mit einem größeren Anteil an CD4+ (durchschnittlich 28%) gegenüber CD8+ Zellen (durchschnittlich 13%) und einem diskretem Auftreten von B-Lymphozyten (durchschnittlich 10%).

**Fazit:** In Ni-ECT-Gewebeproben ohne Ekzemreaktion findet sich ein diskretes CD3+ T-Zellinfiltrat perivaskulär mit einem tendenziellen Überwiegen der CD4+ Zellen und lediglich vereinzeltm Auftreten von CD20+ Zellen.

### 4.3.3 GRUPPE 3

Im Überblick zeigten alle 6 Präparate (- die Probe E2 wird separat beschrieben -) ein T-lymphozytäres Infiltrat. Dieses war bei der Proben 32/03 gering ausgeprägt, bei den Proben 20/03, 28/03, 39/03, 43/03 deutlich und bei E2 als massenhaftes lymphozytäres Infiltrat besonders auffällig.

Tabelle 5.3 stellt die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen zur Charakterisierung des lymphozytären Zellinfiltrats in periimplantären Gewebeproben dar. Auch hier ist jeweils der prozentuale Anteil der angefärbten Zellen an der Gesamtmenge der im jeweiligen Gesichtsfeld ausgezählten Zellzahl dargestellt.

Patient	CD3	CD4	CD8	CD20
20/03	51%	21%	9%	4%
32/03	18%	0%	11%	0%
38/03	88%	89%	38%	6%
39/03	59%	84%	12%	6%
43/03	61%	65%	4%	2%
<b>Mittelwert</b>	55%	52%	15%	4%
<b>Min / Max</b>	18% / 88%	0% / 89%	4% / 38%	0% / 6%

Tab. 4.3: Prozentualer Anteil von Gesamt-T-Zellfärbung (CD3) sowie CD4+ und CD8+ bzw. CD20+(B-)Zellen am Gesamtzellgehalt in periimplantären Gewebeproben (CrCoMo-basierte Hüft-TEP)

In dieser Gruppe war das Vorherrschen eines T-lymphozytären Infiltrats nachweisbar mit durchschnittlich 55% CD3+-Zellen, bei 38/03 maximal mit 88%, während bei 32/03 nur ein relativ diskretes CD3+ Infiltrat nachzuweisen war. Mit Ausnahme von 32/03 war stets ein massives Überwiegen der CD4-Antwort gegenüber der CD8-Antwort zu verzeichnen.

CD20+ B-Zellen sind nur in sehr geringem Maße anzutreffen.

**Fazit:** In den periimplantären Gewebeproben in der Umgebung von CrCoMo-basierten unzementierten Hüfttotalendoprothesen zeichnet sich ein CD3+ T-Zellinfiltrat aus einem massivem Anteil an CD4+ Zellen und einem geringeren Anteil an CD8+ Zellen ab. CD20+ Zellen waren ebenso nur vereinzelt nachweisbar.

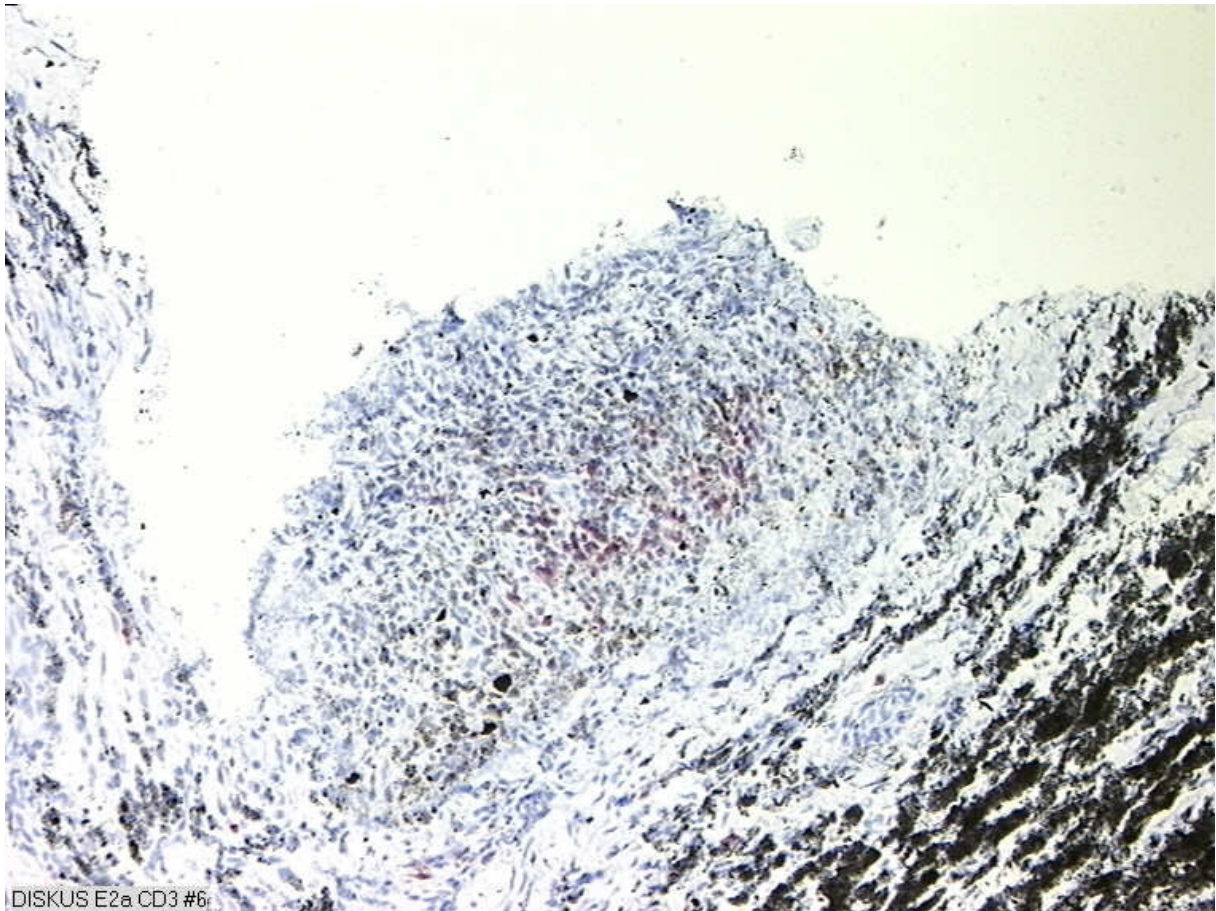
### 4.3.4 Fall E2

Patient	CD3	CD4	CD8	CD20
E2	82%	77%	43%	29%

Tab. 4.4: Prozentualer Anteil von Gesamt-T-Zellfärbung (CD3) sowie CD4+ und CD8+ bzw. CD20+(B-)Zellen am Gesamtzellgehalt in periimplantären Gewebeproben (CrCoMo-basierte Hüft-TEP)

Auch der Fall E2 verhielt sich entsprechend der Gruppe 3 und ähnelte der Gruppe 1 mit einem starkem Vorherrschen eines CD3+ T-zellulären Infiltrats (82%) , wobei die CD4+T-Helferzellen (77%) gegenüber den CD8+ zytotoxischen Zellen (43%) dominierten. Hier lag jedoch auch ein relativ hoher Anteil an B-Zellen (29%) vor.





DISKUS E2a CD3 #6

Bild 4: Immunhistologische Darstellung der CD3+ Zellen innerhalb des Infiltrats in periimplantärem Gewebe (CrCoMo-basierte Hüft-TEP) (E2); ABC-Färbung; Ak: anti-CD3; Chromogen: AEC; Vergrößerung 200-fach; Abriebmaterial ist erkennbar;

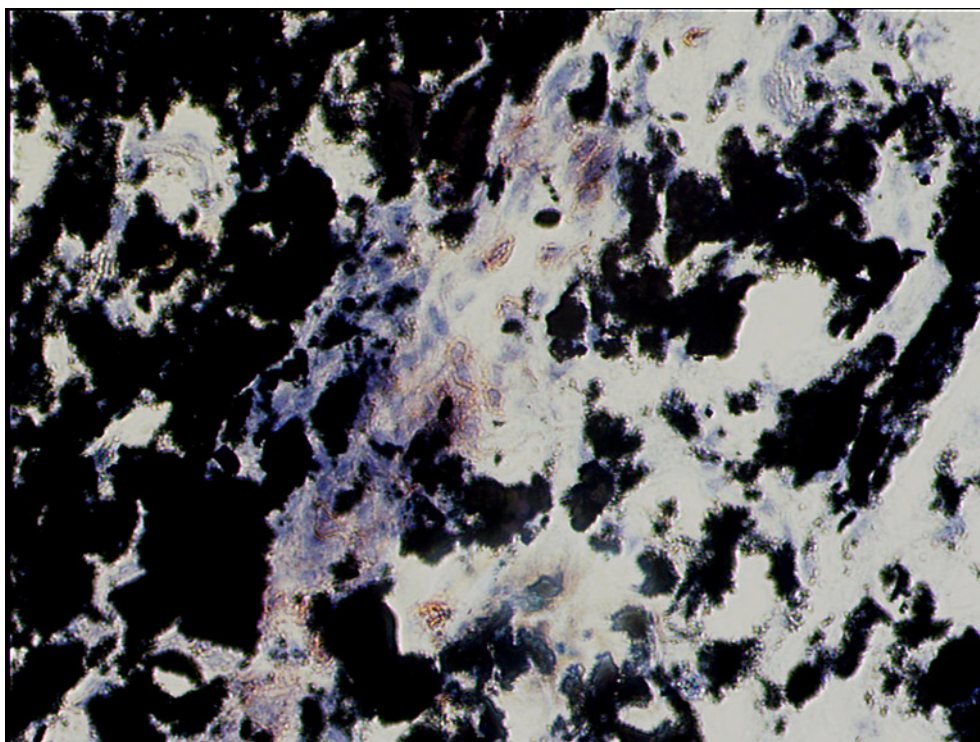


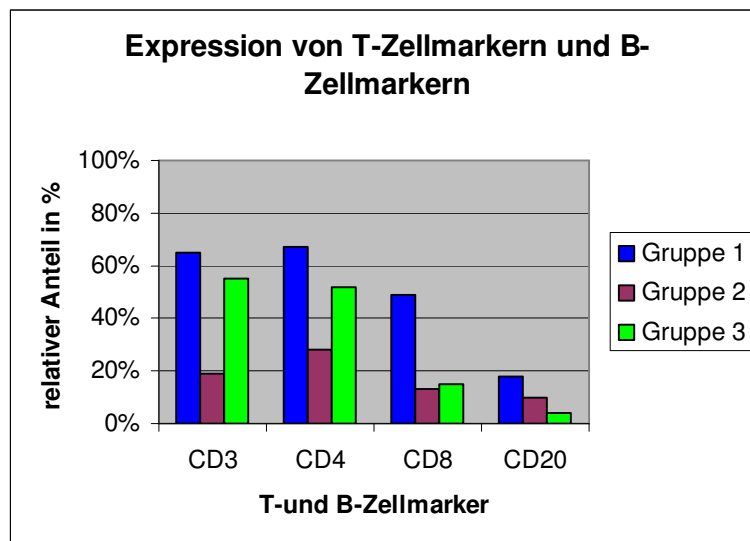
Bild 5: Immunhistologische Darstellung von CD8+ Zellen in periimplantärem Gewebe (CrCoMo-basierte Hüft-TEP) (E2); ABC-Färbung; Ak: anti-CD8; Chromogen: ABC; Vergrößerung 200-fach; Abriebmaterial ist erkennbar.



#### 4.3.5 Zusammenfassung:

In Tabelle 5.4 und Abbildung 5.1 ist eine Zusammenstellung der Resultate der untersuchten Gruppen dargestellt, wobei hier, wie bereits erwähnt, nicht die Gesamtdichte des entzündlichen Infiltrats angegeben ist .

Patientenkollektiv	CD3	CD4	CD8	CD20
Gruppe 1	65%	67%	49%	18%
Gruppe 2	19%	28%	13%	10%
Gruppe 3	55%	52%	15%	4%



Tab. 4.5 und Abb. 4.1: Übersicht über die Expression von T-Zellmarkern und B-Zellmarkern bei den verschiedenen Patientenkollektiven; prozentuale Mittelwerte der Expression von CD3, CD4, CD8 und CD20 in den Gruppen 1, 2 und 3.

In allen Gruppen lag ein CD3+ Zellinfiltrat vor, wobei CD4+ Zellen gegenüber CD8+ Zellen im Durchschnitt stets dominierten und CD20+ Zellen nur vereinzelt nachweisbar waren.

Dabei scheint das zelluläre Infiltrat in den uns vorliegenden periimplantären Gewebeproben ähnlich dem Infiltrat in Ni-ECT-Gewebeproben mit Ekzemreaktion charakterisiert zu sein durch CD3+ T-Lymphozyten mit einem starken Überwiegen der CD4-Antwort gegenüber der CD8-Antwort. Die B-zelluläre Reaktion scheint insgesamt eher nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Klinisch lagen bei den biopsierten Gewebearealen der Gruppe 1 und 2 kein Infekthinweis vor, ebenso wenig bei den Personen der Gruppe 3.

#### **4.4 Präsenz von Makrophagen/Monozyten**

##### **4.4.1 GRUPPE 1**

<b>Patient</b>	<b>CD 14</b>
A 58	13%
A 59	11%
A 67	75%
A 69	68%
A 89	2%

<b>Mittelwert</b>	34%
<b>Min / Max</b>	2% / 75%

Tab. 4.6: Prozentualer Anteil von CD14+Zellen am Gesamtzellgehalt in Ni-ECT-Gewebeproben mit Ekzemreaktion bei Patienten mit Nickelkontaktallergie;

In der Gruppe der Ni-ECT-Gewebeproben mit Ekzemreaktion waren durchschnittlich 34% der Zellen CD14+ mit einer relativ großen individuellen Schwankungsbreite. So waren für das Gewebe A89 nur 2% der ausgezählten Zellen CD14+, für das Gewebe A67 hingegen 75%.

##### **4.4.2 GRUPPE 2**

<b>Patient</b>	<b>CD14</b>
A 52	19%
A 56	16%
A 60	9%
A 66	50%
A 68	62%

<b>Mittelwert</b>	31%
<b>Min / Max</b>	9% / 62%

Tab. 4.7: : Prozentualer Anteil von CD14+Zellen am Gesamtzellgehalt in Ni-ECT-Gewebeproben ohne Ekzemreaktion bei Patienten ohne Nickelkontaktallergie;

Hierbei waren durchschnittlich 31% der Zellen als CD14+Makrophagen zu identifizieren, ebenso mit großen individuellen Unterschieden, 9% bei A60 und 62% bei A 68.

#### **4.4.3 GRUPPE 3**

<b>Patient</b>	<b>CD14</b>
20/03	14%
32/03	92%
38/03	67%
39/03	65%
43/03	18%

<b>Mittelwert</b>	51%
<b>Min / Max</b>	14% / 92%

Tab. 4.8: : Prozentualer Anteil von CD14+Zellen am Gesamtzellgehalt in periimplantären Gewebeproben (CrCoMo-basierte Hüft-TEP);

Makrophagen bzw. Monozyten waren in den meisten periimplantären Gewebeschnitten in relativ großer Zahl (51%) nachweisbar, jedoch mit relativ großen interindividuellen Unterschieden. Vor allem das zelluläre Infiltrat des Gewebes 32/03 bestand hauptsächlich aus Makrophagen mit 92% CD14+Zellen, wohingegen der Anteil der T-Zellen mit 18% eher gering war (siehe 5.2.3). Hingegen waren bei 20/03 nur 14% der ausgezählten Zellen CD14+.

#### **4.4.4 Fall E2**

<b>Patient</b>	<b>CD14</b>
E2	50%

Tab. 4.9: : Prozentualer Anteil von CD14+Zellen am Gesamtzellgehalt in periimplantären Gewebeproben (CrCoMo-basierte Hüft-TEP);

Das Gewebe E2 wies einen Anteil von 50% CD14+ Zellen auf, was dem Durchschnitt der Gruppe 3 entspricht.

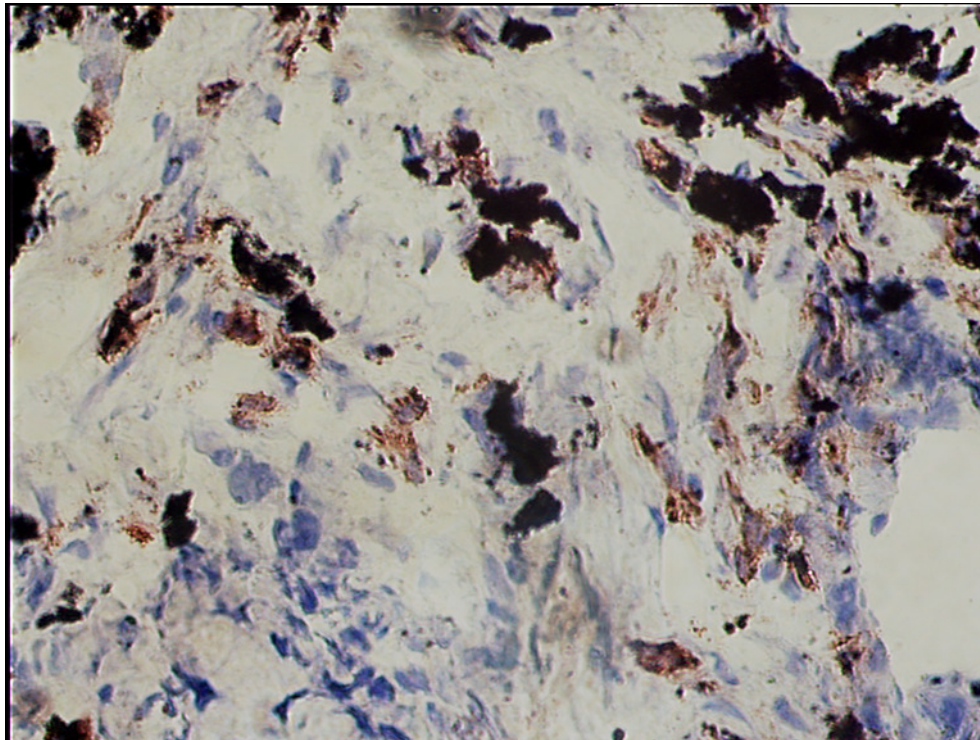
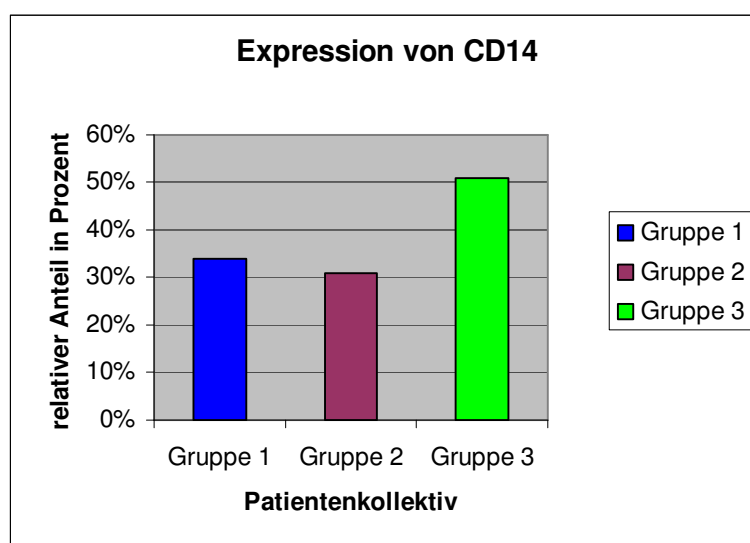


Bild 6: Immunhistologische Darstellung von CD14+ Zellen im Infiltrat in periimplantärem Gewebe (CrCoMo-basierte Hüft-TEP) (E2); ABC-Färbung; Ak: anti-CD14; Chromogen: ABC; Vergrößerung 200-fach; Abriebmaterial ist erkennbar.

#### 4.4.5 Zusammenfassung

Patientenkollektiv	CD14
Gruppe 1	34%
Gruppe 2	31%
Gruppe 3	51%



Tab. 4.10 und Abb. 4.2: Übersicht über die Expression von CD14 bei den verschiedenen Patientenkollektiven; prozentuale Mittelwerte der Expression von CD 14 in den Gruppen 1, 2 und 3.

Zusammenfassend scheint in der Gruppe der periimplantären Gewebe mit 51% (Gr. 3) bzw. 50% (Fall E2) CD14+ Zellen ein vergleichsweise etwas höherer Anteil an

Makrophagen vorzuherrschen, möglicherweise im Zusammenhang mit den unterschiedlich stark erkennbaren Metallpartikeln im Gewebe. Bei E2 war dies besonders ausgeprägt. Der entsprechende Anteil von 34% für Gruppe 1 und 31% für Gruppe 2 ähnelt sich. Auffallend ist in allen Gruppen die große individuelle Schwankungsbreite.

#### **4.5 Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und CD62E ( auf Endothelzellen )**

Die Beurteilung der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und CD62E erfolgte qualitativ.

##### **4.5.1 GRUPPE 1**

ICAM-1 wurde bei A58, A67, A69 und A89 in allen angeschnittenen Gefäßen exprimiert, bei A 59 jedoch nur in vereinzelt Gefäßen.

CD62E war bei A69 in allen, bei A58, A59 und A89 in zahlreichen sowie bei A67 in vereinzelt Gefäßanschnitten nachweisbar.

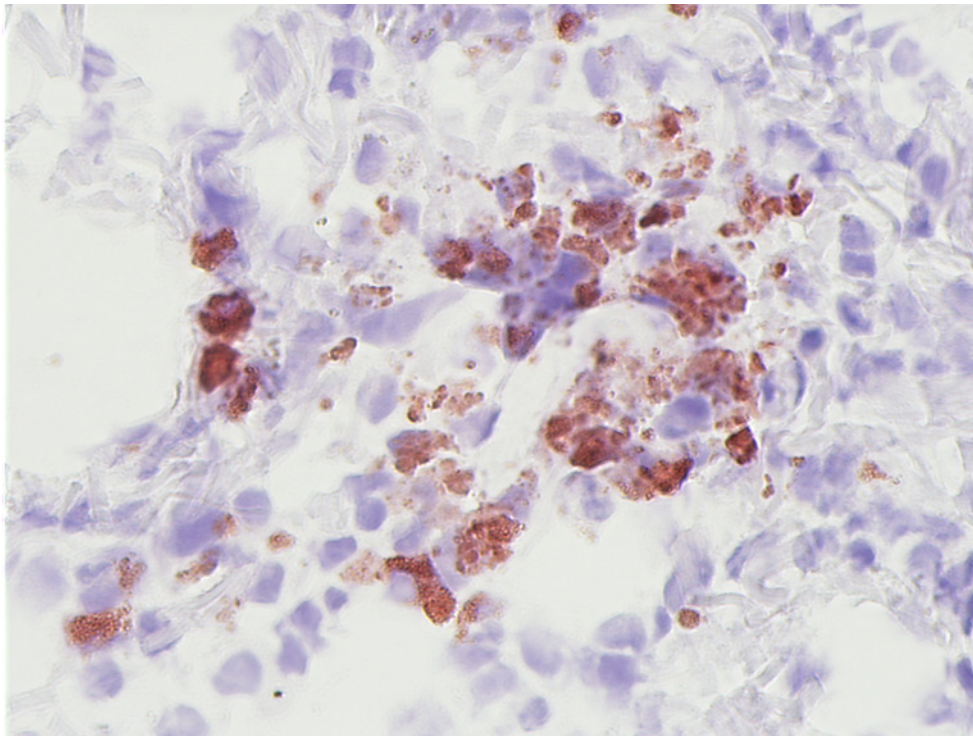


Bild 7: Expression von CD62E bei einem Patienten mit Nickelallergie (A89); ABC-Färbung; Ak: anti-CD62E, Chromogen AEC; Vergrößerung 400-fach;

##### **4.5.2 GRUPPE 2**

Während A56 und A66 eine Expression von ICAM-1 in wenigen angeschnittenen Gefäßen zeigten, war das Adhäsionsmolekül bei A52 und A68 nur für sehr vereinzelt Endothelzellen, bei A60 gar nicht nachweisbar.

CD62E konnte in keiner der Proben angefärbt werden.



#### **4.5.3 GRUPPE 3**

Die periimplantären Gewebeproben 20/03, 32/03, 38/03 sowie 39/03 wiesen eine Expression von ICAM-1 in zahlreichen Gefäßanschnitten auf, 43/03 eine etwas geringere Anfärbung in vereinzelt Gefäßen.

Eine Anfärbung von CD62E war nur für die Proben 38/03 und 39/03 in einigen angeschnittenen Gefäßen möglich.

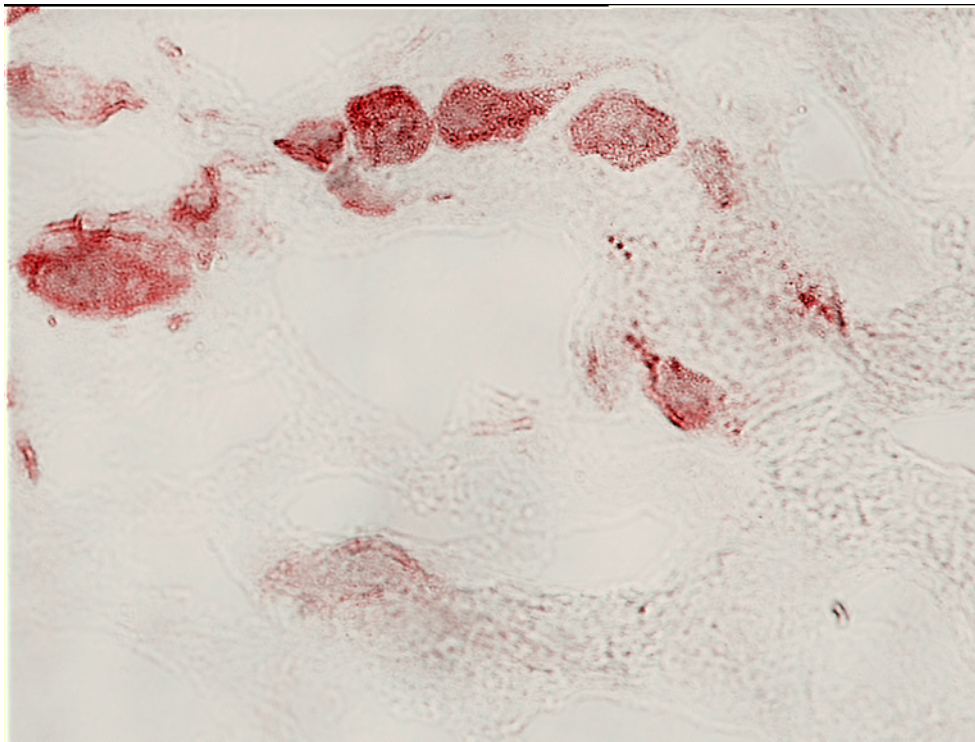


Bild 8: Expression von ICAM-1 in periimplantärem Gewebe (CrCoMo-basierte Hüft-TEP) (20/03); ABC-Färbung; Ak: anti-ICAM-1; Chromogen: AEC; Vergrößerung 400-fach;

#### **4.5.4 Fall E2**

Das Präparat E2 ließ sowohl eine Expression von ICAM-1 wie auch von CD62E in mehreren Gefäßen erkennen.

#### **4.5.5 Zusammenfassung**

Hinsichtlich der Expression von Adhäsionsmolekülen war auffallend, dass ICAM-1 in beträchtlichem Ausmaße in den Gruppen 1 und 3 nachweisbar war. Ein Nachweis von CD62E war ebenso nur in den Gewebeproben dieser beiden Gruppen möglich, nicht jedoch für die Patienten ohne Nickelallergie der Gruppe 2.

## 4.6 Expression der Aktivierungsmarker IL-2R und CD69

### 4.6.1 GRUPPE 1

Patient	IL-2R	CD69
A 58	34%	*
A 59	13%	15%
A 67	5%	6%
A 69	3%	3%
A 89	67%	52%

<b>Mittelwert</b>	24%	19%
<b>Min / Max</b>	3% / 67%	3% / 52%

Tab. 4.11: Prozentualer Anteil von IL-2R und CD69+Zellen am Gesamtzellgehalt in Ni-ECT-Gewebeproben mit Ekzemreaktion bei Patienten mit Nickelkontaktallergie;

\* Diese Färbung war nicht mehr durchführbar, da das Gewebe bereits vollständig aufgebraucht war;

In allen Fällen war die Expression von IL-2-Rezeptor als klassischer Aktivierungsmarker der T-Zellen nachweisbar, maximal bei A89 mit 67%, minimal bei den Geweben mit dem höchstem Makrophagenanteil A67 und A69 (5% bzw. 3%)(siehe 5.3.1).

Ebenso war der zeitlich früher exprimierte Aktivierungsmarker CD69 für alle Gewebe der Gruppe färbetechnisch identifizierbar, maximal ebenso bei A89, minimal ebenso bei A67/69.

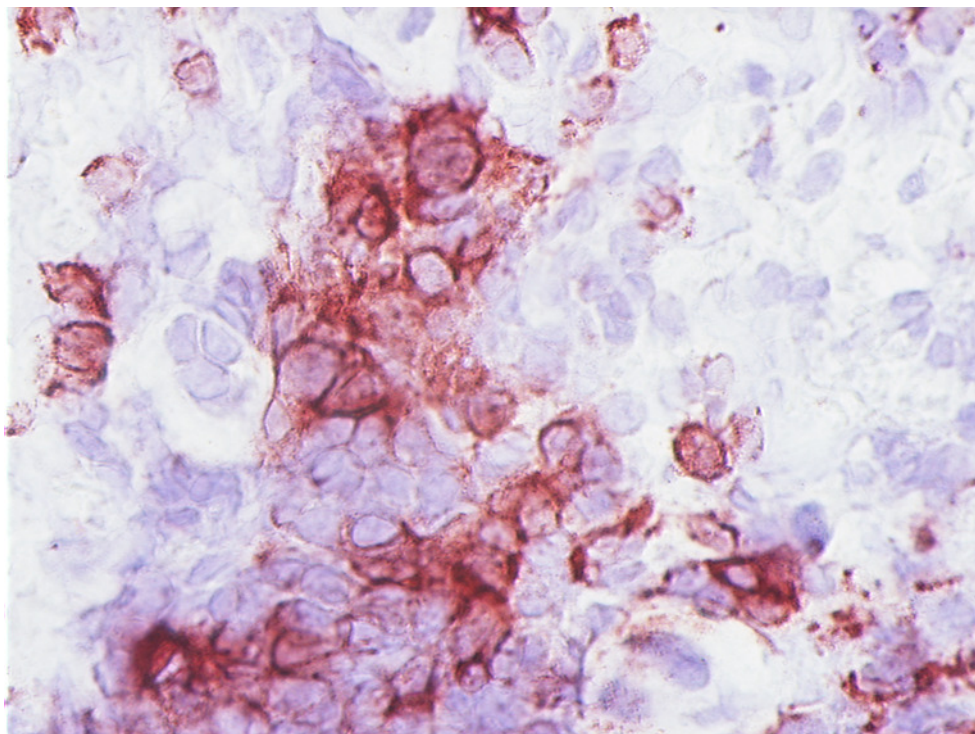


Bild 9: Immunhistologische Darstellung von IL-2R+ Zellen im dermalen Infiltrat bei einem Patienten mit Nickelallergie (A89); ABC-Färbung; Ak: anti-IL-2R; Chromogen: AEC; Vergrößerung: 400-fach;

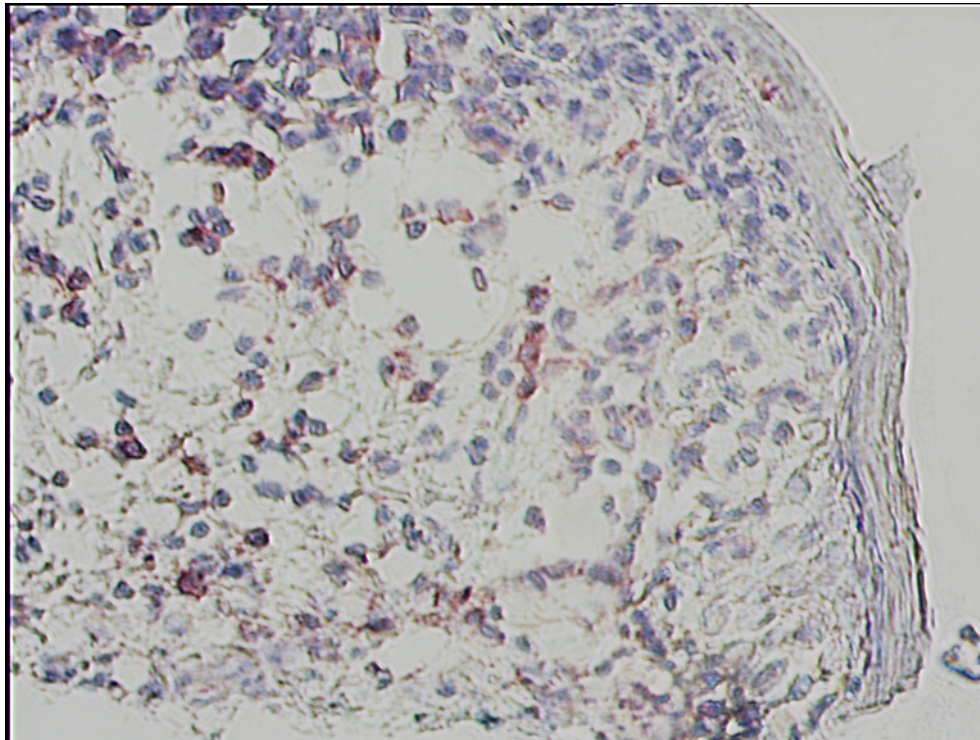


Bild 10: Immunhistologische Darstellung von CD69+ Zellen im dermalen Infiltrat bei einem Patienten mit Nickelallergie (A89); ABC-Färbung; Ak: anti-CD69; Chromogen: AEC; Vergrößerung: 200-fach;

#### 4.6.2 **GRUPPE 2**

Patient	IL-2R	CD69
A 52	0%	10%
A 56	0%	2%
A 60	4%	*
A 66	0%	14%
A 68	0%	1%
<b>Mittelwert</b>		
	1%	7%
<b>Min / Max</b>		
	0% / 4%	1% / 14%

Tab. 4.12: Prozentualer Anteil von IL-2R und CD69+Zellen am Gesamtzellgehalt in Ni-ECT-Gewebeproben ohne Ekzemreaktion bei Patienten ohne Nickelkontaktallergie;

\* Diese Färbung war nicht mehr durchführbar, da das Gewebe bereits vollständig aufgebraucht war;

Nur für A60 gelang der Nachweis des Aktivierungsmarkers IL-2R mit 4%, CD69 war hingegen für die bearbeiteten Gewebe in allen Fällen in geringem Maße nachweisbar. In den Proben der Gruppe 2 war insgesamt jeweils nur ein geringes Zellinfiltrat nachweisbar.



#### **4.6.3 GRUPPE 3**

<b>Patient</b>	<b>IL-2R</b>	<b>CD69</b>
20/03	0%	24%
32/03	0%	0%
38/03	22%	0%
39/03	6%	0%
43/03	0%	6%
<b>Mittelwert</b>	6%	6%
<b>Min / Max</b>	0% / 22%	0% / 24%

Tab. 4.13: Prozentualer Anteil von IL-2R und CD69+Zellen am Gesamtzellgehalt in periimplantären Gewebeproben (CrCoMo-basierte Hüft-TEP)

Für die periimplantären Gewebe der Gruppe 3 war nur teilweise eine Expression von IL-2R oder CD69 erkennbar. Dies fehlte ganz bei der Probe 32/03, ein Gewebe mit geringfügigem T-Zell- und hohem Makrophagen-Anteil. Bei 38/03 fanden sich 22% IL-2R+ Zellen, bei 20/03 24% CD69+ Zellen.

#### **4.6.4 Fall E2**

<b>Patient</b>	<b>IL-2R</b>	<b>CD69</b>
20/03	9%	13%

Tab. 4.14: Prozentualer Anteil von IL-2R und CD69+Zellen am Gesamtzellgehalt in periimplantären Gewebeproben (CrCoMo-basierte Hüft-TEP)

9% der Zellen des periimplantären Gewebes E2 zeigten sich IL-2R+ sowie auch ein verhältnismäßig hoher Anteil CD69+ (13%), was aufgrund der Bedeutung von CD69 als frühzeitiger Aktivierungsmarker möglicherweise Hinweis ist auf eine andauernde Aktivierung von T-Zellen durch Bestandteile des Metallimplantats.

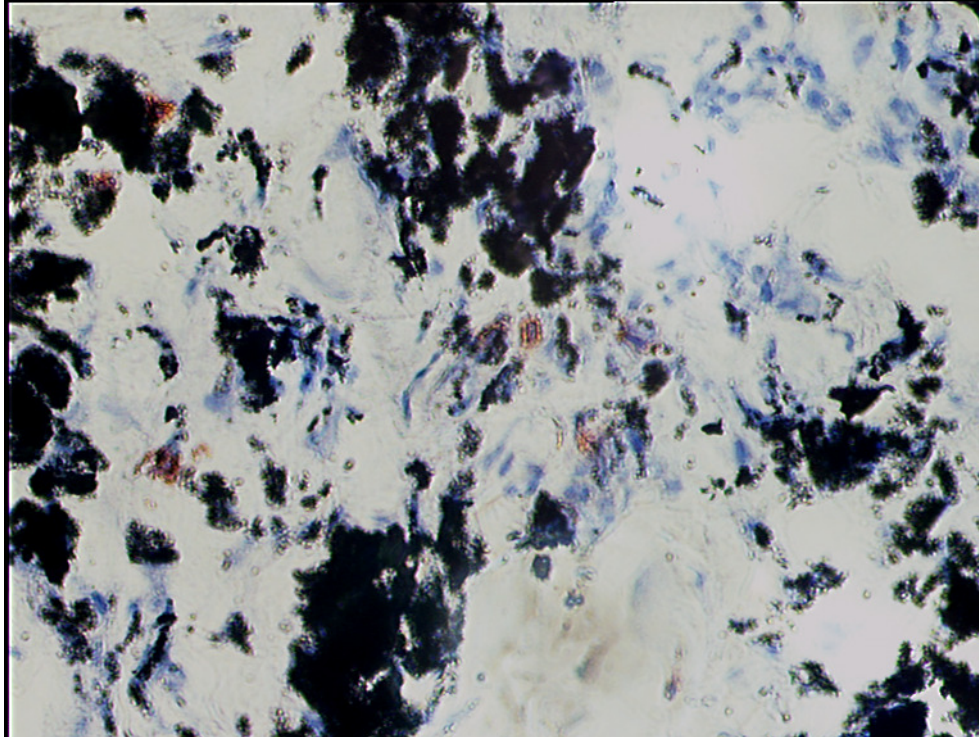
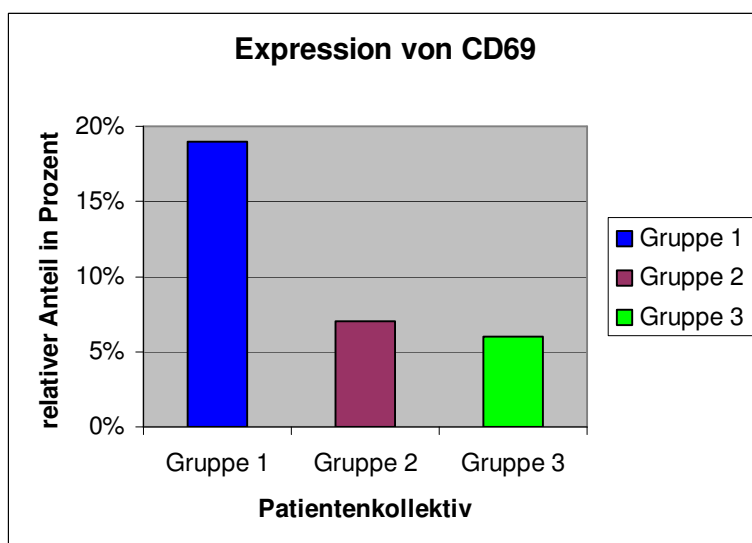
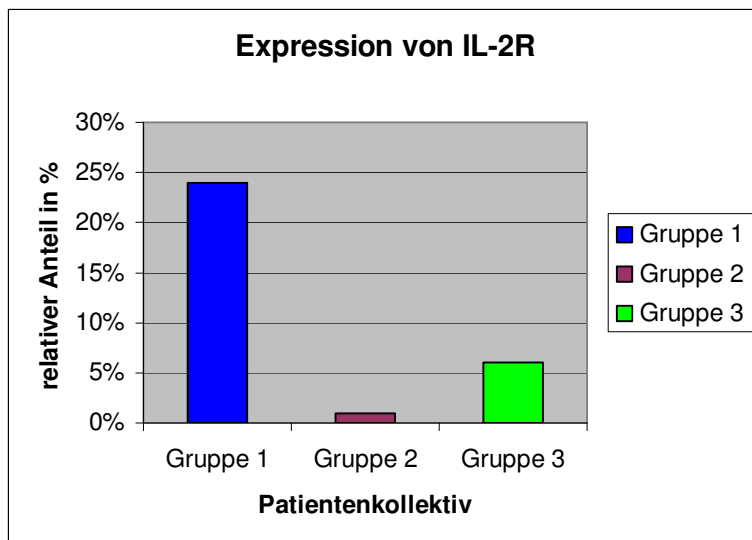


Bild 11: Immunhistologische Darstellung von IL-2R+ Zellen im Infiltrat in periimplantärem Gewebe (CrCoMo-basierte Hüft-TEP) (E2)  
ABC-Färbung; Ak: anti-IL-2R; Chromogen: AEC; Vergrößerung: 200-fach; Abriebmaterial ist erkennbar.

#### **4.6.5 Zusammenfassung**

Im Überblick ergeben sich die in Tabelle dargestellten Mittelwerte der prozentualen Expression von IL-2R und CD69 in den einzelnen Gruppen.

<b>Patientenkollektiv</b>	<b>IL-2R</b>	<b>CD69</b>
<b>Gruppe 1</b>	24%	19%
<b>Gruppe 2</b>	1%	7%
<b>Gruppe 3</b>	6%	6%



Tab. 4.15 und Abb. 4.3.a, 4.3.b: Übersicht über die Expression von IL-2R und CD69 bei den verschiedenen Patientenkollektiven; Prozentuale Mittelwerte der Expression von IL-2R und CD69 in den Gruppen 1,2 und 3.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass vor allem in Ni-ECT-Gewebeproben mit Ekzemreaktion eine starke Expression von T-Zell-Aktivierungsmarkern vorliegt, sowohl von IL-2R (24%) als auch von CD69 (19%).

Für periimplantäre Gewebe gilt dies in weitaus geringerem Maße. Dabei wurde in den einzelnen Proben entweder IL-2R oder CD69 exprimiert, E2 zeigte die deutlichste Expression beider Marker, v.a. von CD69 (13%). Allerdings bestand insgesamt eine vergleichbar niedrige Expression von CD69 in Gruppe 2 und 3.

Ni-ECT-Gewebeproben ohne Ekzemreaktion zeigten insgesamt nur eine geringfügige Expression der T-Zell-Aktivierungsmarker.

## **4.7 Ausprägung der proliferativen Aktivität im Infiltrat**

### **4.7.1 GRUPPE 1**

Wie in Abbildung 12 erkennbar, konnte der Proliferationsmarker Ki67 sowohl in der Epidermis als auch im Infiltrat nachgewiesen werden. Die prozentuale Verteilung von Ki67+Zellen am dermalen Zellinfiltrat der verschiedenen Proben aus Ni-ECT-Gewebearealen mit Ekzemreaktion ist in Tabelle 5.13 dargestellt.

Patient	Ki67
A 58	10%
A 59	19%
A 67	3%
A 69	3%
A 89	8%

<b>Mittelwert</b>	9%
<b>Min / Max</b>	3% / 19%

Tab. 4.16: Prozentualer Anteil von Ki67+Zellen am Gesamtzellgehalt in Ni-ECT-Gewebeproben mit Ekzemreaktion von Patienten mit Nickelkontaktallergie;

Ki67 konnte in der Gruppe 1 durchschnittlich auf 9% der Zellen im Infiltrat färbetechnisch markiert werden, maximal bei A59 (19%), minimal erneut bei den Geweben mit dem höchsten Makrophagenanteil A67/69 (jeweils 3%).

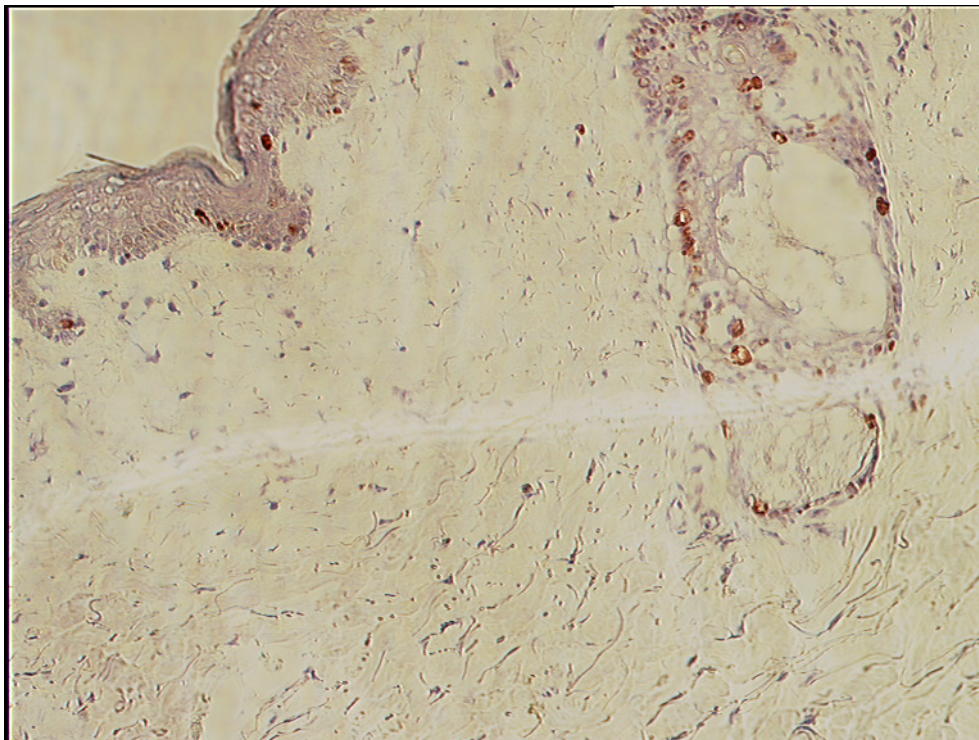


Bild 12: Immunhistologische Darstellung von Ki67+ Zellen im dermalen Infiltrat bei einem Patienten mit Nickelallergie (A89); ABC-Färbung; Ak: anti-Ki67; Chromogen: AEC; Vergrößerung: 100-fach;

#### **4.7.2 GRUPPE 2**

<b>Patient</b>	<b>Ki67</b>
A 52	0%
A 56	3%
A 60	4%
A 66	6%
A 68	2%

<b>Mittelwert</b>	5%
<b>Min / Max</b>	0% / 6%

Tab. 4.17: Prozentualer Anteil von Ki67+Zellen am Gesamtzellgehalt in Ni-ECT-Gewebeproben ohne Ekzemreaktion von Patienten ohne Nickelkontaktallergie;

Auch in der Gruppe 2 war proliferative Aktivität in der Epidermis erkennbar. Der Nachweis von Ki67 im dermalen Infiltrat gelang aber nur in sehr geringem Maße. Bei A52 wiesen 0% der ausgezählten Zellen den Proliferationsmarker auf.

#### **4.7.3 GRUPPE 3**

<b>Patient</b>	<b>Ki67</b>
20/03	16%
32/03	23%
38/03	27%
39/03	22%
43/03	11%

<b>Mittelwert</b>	20%
<b>Min / Max</b>	11% / 27%

Tab. 4.18: Prozentualer Anteil von Ki67+Zellen am Gesamtzellgehalt in periimplantären Gewebeproben (CrCoMo-basierte Hüft-TEP);

Eine relativ hohe proliferative Aktivität zeigte sich im Zellinfiltrat der Gewebeproben der Gruppe 3 mit durchschnittlich 20% Ki67+ Zellen.

#### **4.7.4 Fall E2**

<b>Patient</b>	<b>Ki67</b>
E2	25%

Tab. 4.19: Expression von Ki67 in periimplantären Gewebeproben (CrCoMo-basierte Hüft-TEP);

25% der im Präparat E2 ausgezählten Zellen erwiesen sich als Ki67+.



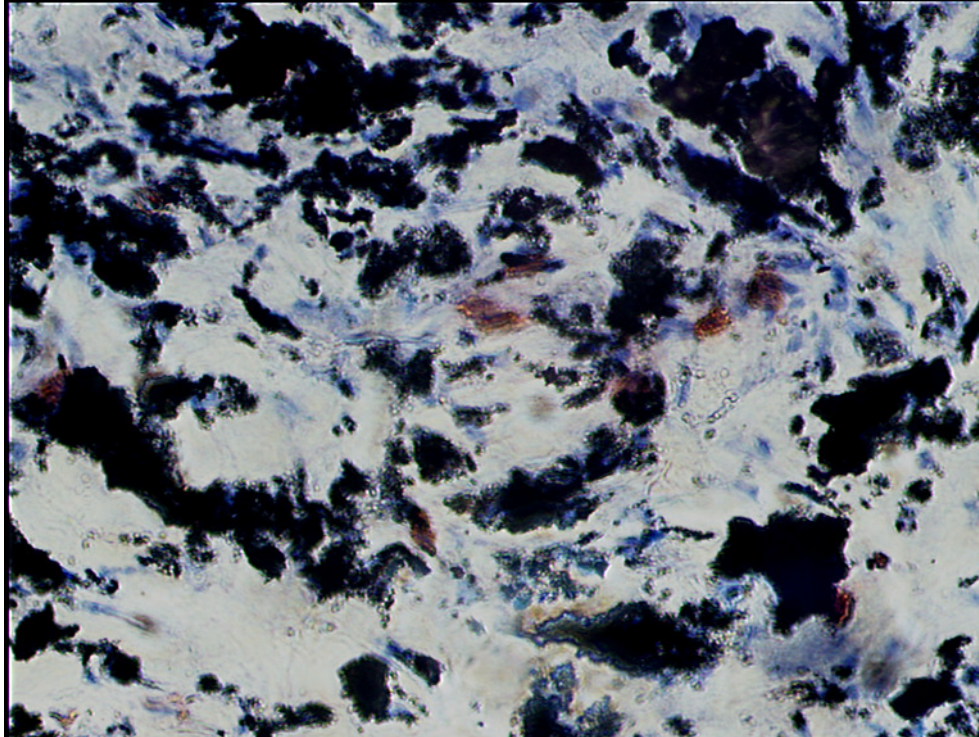


Bild 13: Immunhistologische Darstellung von Ki67+ Zellen im Infiltrat in periimplantärem Gewebe (CrCoMo-basierte Hüft-TEP) (E2)  
ABC-Färbung; Ak: anti-Ki67; Chromogen: AEC; Vergrößerung: 200-fach; Abriebmaterial ist erkennbar.

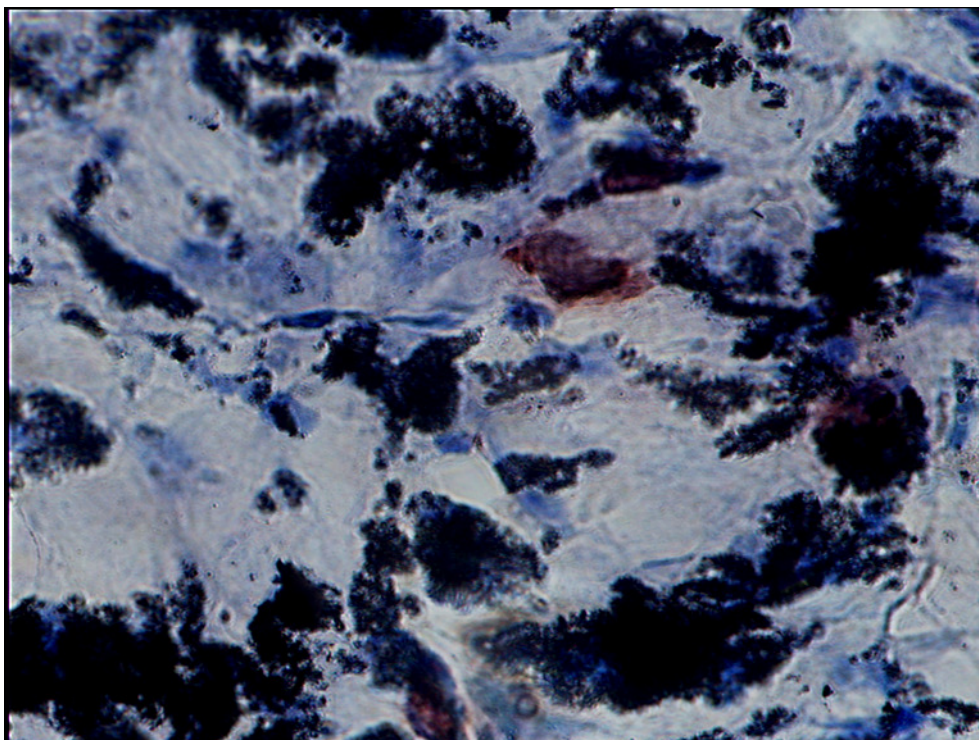
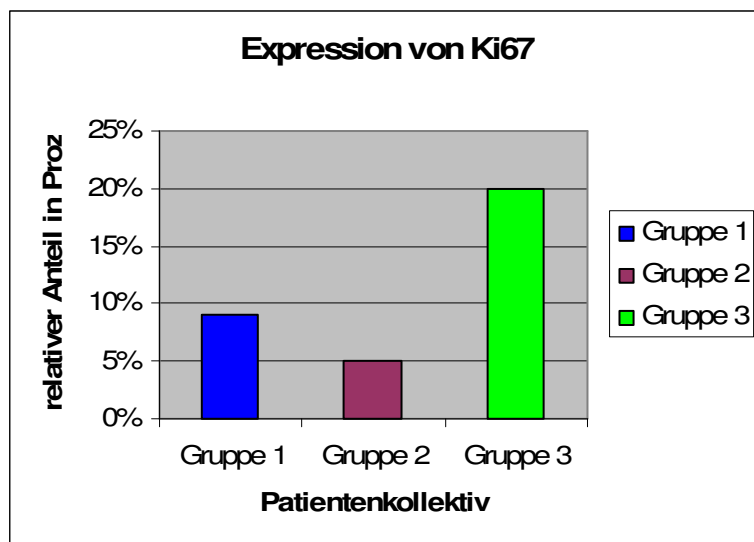


Bild 14: Immunhistologische Darstellung von Ki67+ Zellen im Infiltrat in periimplantärem Gewebe (CrCoMo-basierte Hüft-TEP) (E2)  
ABC-Färbung; Ak: anti-Ki67; Chromogen: AEC; Vergrößerung: 400-fach; Abriebmaterial ist erkennbar.

#### **4.7.5 Zusammenfassung**

Patientenkollektiv	Ki67
Gruppe 1	9%
Gruppe 2	5%
Gruppe 3	20%



Tab 4.20 und Abb. 4.6: Übersicht über die Expression von Ki67 bei den verschiedenen Patientenkollektiven; Prozentuale Mittelwerte der Expression von Ki67 in den Gruppen 1,2 und 3.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die proliferative Aktivität im Infiltrat der Gruppe 1 stärker als in der Gruppe 2 war.

Die höchste Expression von Ki67 fand sich in der Gruppe der periimplantären Gewebe, die sich möglicherweise aus der Proliferation des entzündlichen Infiltrats (T-Zellen und Makrophagen) zum einen wie auch der gewebeeigenen Fibroblasten erklärt.

#### **4.8 Differenzierung in naive CD45RA+ T-Zellen und sensibilisierte CD45RO+ T-Zellen**

Es wurde die Expression von CD45RA (vornehmlich auf naiven T-Zellen) sowie von CD45RO (vornehmlich auf memory-Zellen) in Anteil am Gesamtzellgehalt der verschiedenen Gewebegruppen bestimmt.

#### 4.8.1 GRUPPE 1

Patient	CD45RA	CD45R0
A 58	44%	84%
A 59	28%	63%
A 67	11%	65%
A 69	3%	77%
A 89	42%	96%

<b>Mittelwert</b>	26%	77%
<b>Min / Max</b>	3% / 44%	63% / 96%

Tab. 4.21: Prozentualer Anteil von CD45RA+Zellen und CD45R0+Zellen am Gesamtzellgehalt in Ni-ECT-Gewebeproben mit Ekzemreaktion bei Patienten mit Nickelkontaktallergie;

In der Gruppe 1 überwogen CD45R0+ Memory-Zellen (77%) deutlich gegenüber den naiven CD45RA+-Zellen (26%) in allen Fällen, so dass ein Vorherrschen von Memory-T-Zellen anzunehmen ist.

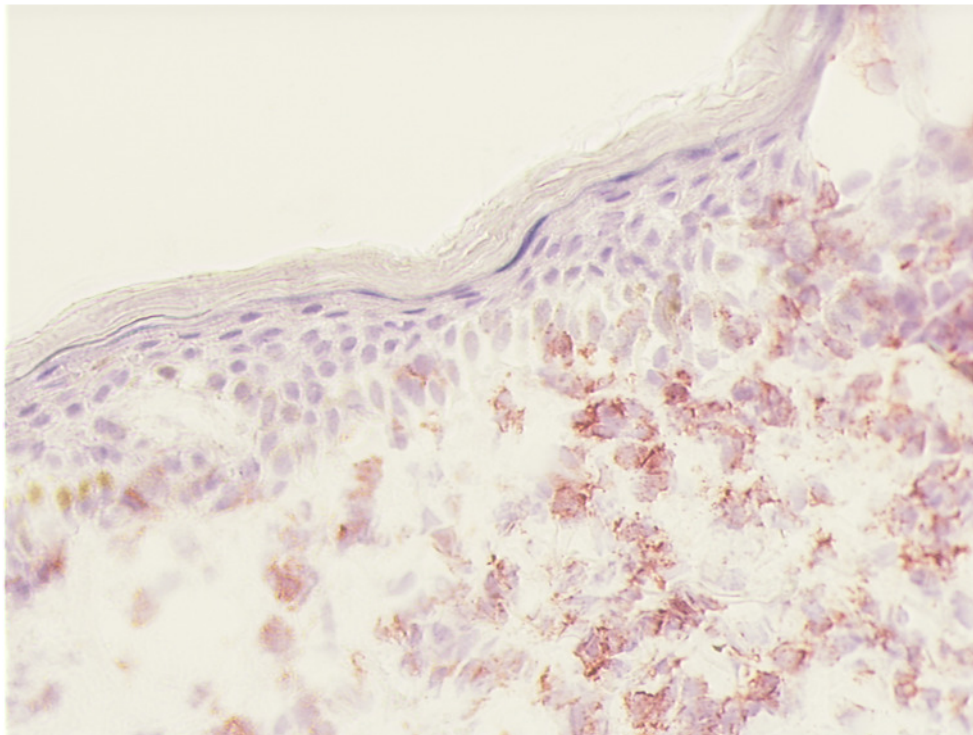


Bild 15: Immunhistologische Darstellung von CD45R0+ Zellen im dermalen Infiltrat bei einem Patienten mit Nickelallergie (A89); ABC-Färbung; Ak: anti-CD45R0; Chromogen: AEC; Vergrößerung: 200-fach;



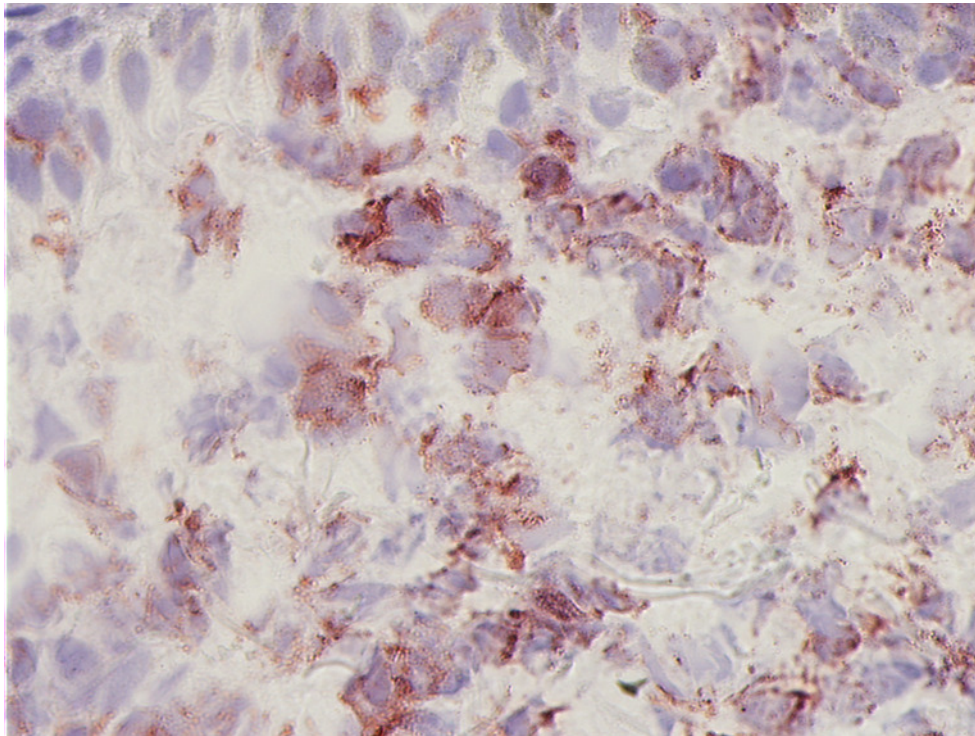


Bild 16: Immunhistologische Darstellung von CD45R0+ Zellen im dermalen Infiltrat bei einem Patienten mit Nickelallergie (A89); ABC-Färbung; Ak: anti-CD45R0; Chromogen: AEC; Vergrößerung: 400-fach;

#### **4.8.2 GRUPPE 2**

In den Kontrollgeweben der Patienten ohne Nickelkontaktallergie waren CD45R0+Zellen deutlich geringer vorhanden.

<b>Patient</b>	<b>CD45RA</b>	<b>CD45R0</b>
A 52	11%	16%
A 56	4%	23%
A 60	6%	12%
A 66	3%	42%
A 68	4%	14%
<b>Mittelwert</b>		
	6%	21%
<b>Min / Max</b>		
	3% / 11%	12% / 42%

Tab. 4.22: Prozentualer Anteil von CD45RA+Zellen und CD45R0+Zellen am Gesamtzellgehalt in NI-ECT-Gewebeproben ohne Ekzemreaktion bei Patienten ohne Nickelkontaktallergie;

Auch die Gruppe 2 zeigte ein Vorherrschen der CD45R0+-Zellen (21%) gegenüber den CD45RA+-Zellen (6%), jedoch mit weitaus geringeren durchschnittlichen prozentualen Anteilen.

### 4.8.3 GRUPPE 3

In den periimplantären Geweben ließen sich im Durchschnitt wieder mehr CD45RO+Zellen anfärben.

Patient	CD45RA	CD45R0
20/03	55%	86%
32/03	3%	42%
38/03	81%	80%
39/03	20%	87%
43/03	4%	12%

Mittelwert	33%	61%
Min / Max	3% / 55%	12% / 87%

Tab. 4.23: Expression von CD45RA und CD45R0 in periimplantären Gewebeproben (Typ ESKA);

Ebenso ist hier das starke Überwiegen der CD45R0+ Memory-Zellen (61%) gegenüber den CD45RA+ naiven T-Zellen (33%) auffallend. Dabei fiel der Nachweis dieser Sensibilisierungsmarker für das Gewebe 43/03 prozentual am geringsten aus mit 4% CD45RA+ und 12% CD45R0+ Zellen.

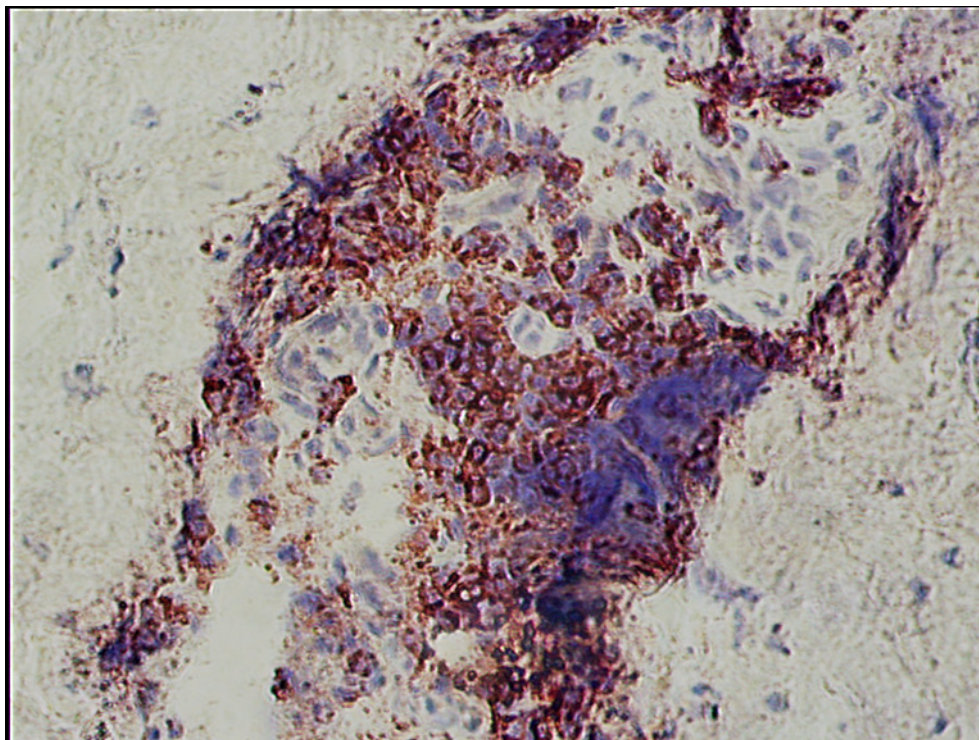


Bild 17: Immunhistologische Darstellung von CD45RA+ Zellen im Infiltrat in periimplantärem Gewebe (CrCoMo-basierte Hüft-TEP) (38/03); ABC-Färbung; Ak: anti-CD45RA; Chromogen: AEC; Vergrößerung 200-fach;



#### **4.8.4 Fall E2**

Ähnlich der Gruppe 1 und 3 verhielt sich auch E2.

Patient	CD45RA	CD45R0
E2	55%	86%

Tab. 4.24: Expression von CD45RA und CD45R0 in periimplantären Gewebeproben (Typ Metasul);

Auch für E2 war ein deutliches Vorherrschen von CD45R0+ Zellen (86%) gegenüber CD45RA+ Zellen (55%) auffallend.

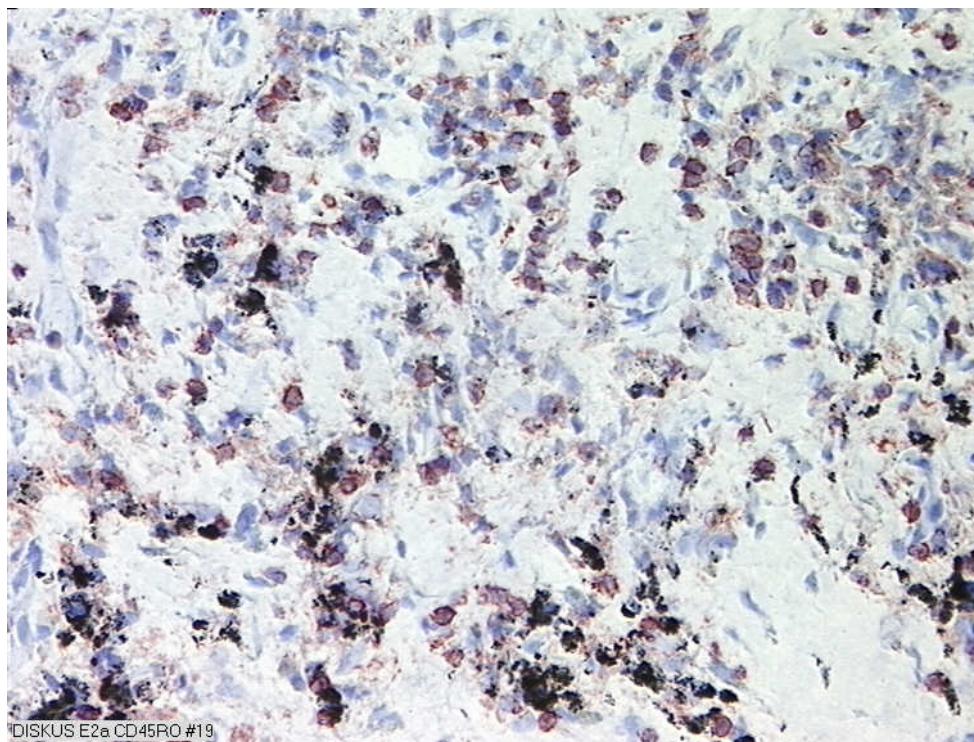
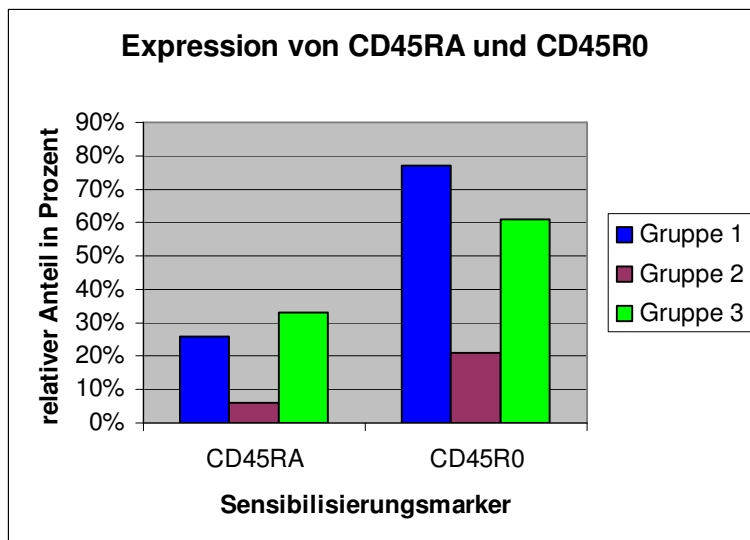


Bild 18: Immunhistologische Darstellung von CD45R0+ Zellen im Infiltrat in periimplantärem Gewebe (CrCoMo-basierte Hüft-TEP) (E2);  
ABC-Färbung; Ak: anti-CD45R0; Chromogen: AEC; Vergrößerung 200-fach;

#### **4.8.5 Zusammenfassung**

In Tab. 4.25 und Abb. 4.7 sind nochmals im Überblick die Mittelwerte der prozentualen Anteile der CD45R0+ bzw. CD45RA+ Zellen am Gesamtzellgehalt der jeweiligen Gewebegruppen dargestellt.

Patientenkollektiv	CD45RA	CD45R0
Gruppe 1	26%	77%
Gruppe 2	6%	21%
Gruppe 3	33%	61%



Tab.4.25 und Abb.4.7: Übersicht über die Expression von CD45RA und CD45R0 bei den verschiedenen Patientenkollektiven;

In allen Gruppen ist ein starkes Übergewicht der CD45R0+ Memory-Zellen gegenüber den CD45RA+ Zellen zu verzeichnen, wobei sowohl in Gruppe 1 als auch bei den periimplantären Geweben insbesondere ein sehr hoher Anteil an Memory-Zellen als Hinweis auf eine Antigen-gerichtete Immunantwort vorliegt. Des Weiteren weist die Gruppe 3 allerdings auch einen verhältnismäßig hohen Anteil an CD45RA+ T-Zellen (33%) auf.

#### 4.9 Expression des Aktivierungsmarkers CD40 ( auf Makrophagen/B-Zellen )

Es wurde außerdem die Expression von CD40 als Aktivierungsmarker (vornehmlich auf Makrophagen) für die einzelnen Gewebegruppen untersucht.

##### 4.9.1 GRUPPE 1

Patient	CD40
A 58	*
A 59	8%
A 67	0%
A 69	22%
A 89	97%

<b>Mittelwert</b>	32%
<b>Min / Max</b>	0% / 97%

Tab. 4.26: Prozentualer Anteil von CD40+Zellen am Gesamtzellgehalt in Ni-ECT-Gewebeproben mit Ekzemreaktion von Patienten mit Nickelkontaktallergie;

\* Diese Färbung war nicht mehr durchführbar, da das Gewebe bereits vollständig aufgebraucht war;

Durchschnittlich 32% der ausgezählten Zellen exprimierten CD40 auf der Zelloberfläche, bei A89 sogar 97%, wohingegen ein entsprechender Nachweis bei A67 nicht gelang.

#### **4.9.2 GRUPPE 2**

<b>Patient</b>	<b>CD40</b>
A 52	0%
A 56	0%
A 60	*
A 66	0%
A 68	0%

<b>Mittelwert</b>	0%
<b>Min / Max</b>	0% / 0%

Tab. 4.27: Prozentualer Anteil von CD40+Zellen am Gesamtzellgehalt in Ni-ECT-Gewebeproben ohne Ekzemreaktion von Patienten ohne Nickelkontaktallergie;

\* Diese Färbung war nicht mehr durchführbar, da das Gewebe bereits vollständig aufgebraucht war;

In keiner der Proben der Gruppe 2 konnte eine Expression des Aktivierungsmarkers CD40 nachgewiesen werden.

#### **4.9.3 GRUPPE 3**

<b>Patient</b>	<b>CD40</b>
20/03	67%
32/03	78%
38/03	82%
39/03	81%
43/03	71%

<b>Mittelwert</b>	76%
<b>Min / Max</b>	67% / 82%

Tab. 4.28: Expression von CD40 in periimplantären Gewebeproben (CrCoMo-basierte Hüft-TEP);

Sämtliche periimplantäre Gewebeproben der Gruppe 3 wiesen einen hohen Anteil an CD40+ Zellen auf, durchschnittlich 76% und somit aufgrund des äußerst geringen Anteils an B-Zellen eine anscheinend sehr ausgeprägte Aktivierung der Makrophagen.

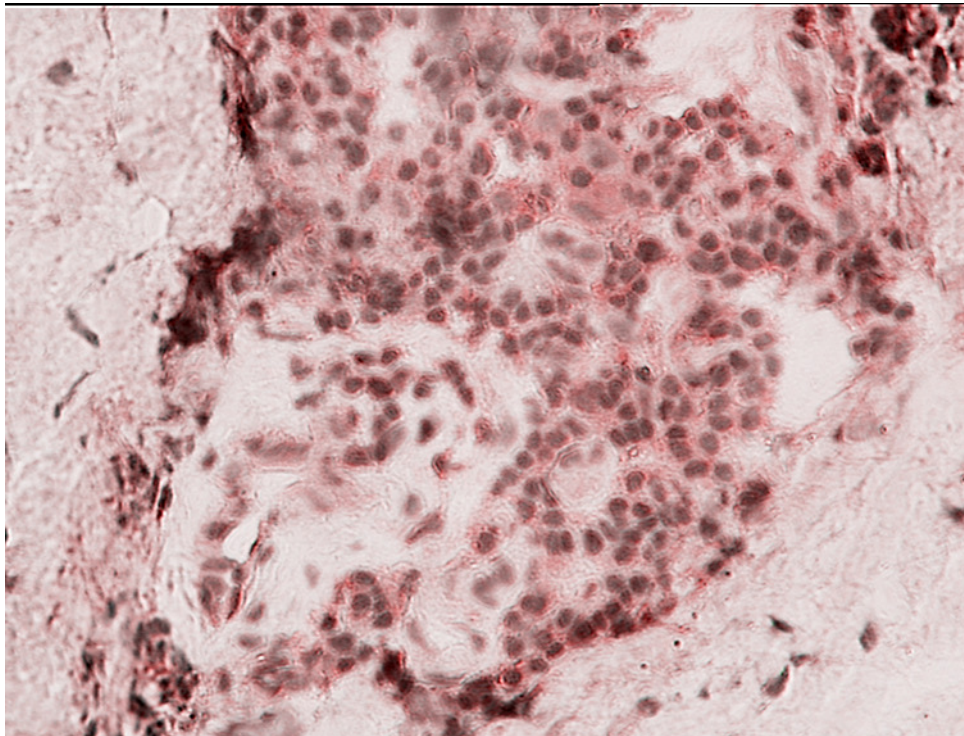


Bild 19: Immunhistologische Darstellung von CD40+ Zellen im Infiltrat in periimplantärem Gewebe (CrCoMo-basierte Hüft-TEP) (38/03);  
ABC-Färbung; Ak: anti-CD40; Chromogen: AEC; Vergrößerung 200-fach;

#### **4.9.4 Fall E2**

E2 wies insgesamt nur wenige CD40+Zellen (5%) auf.

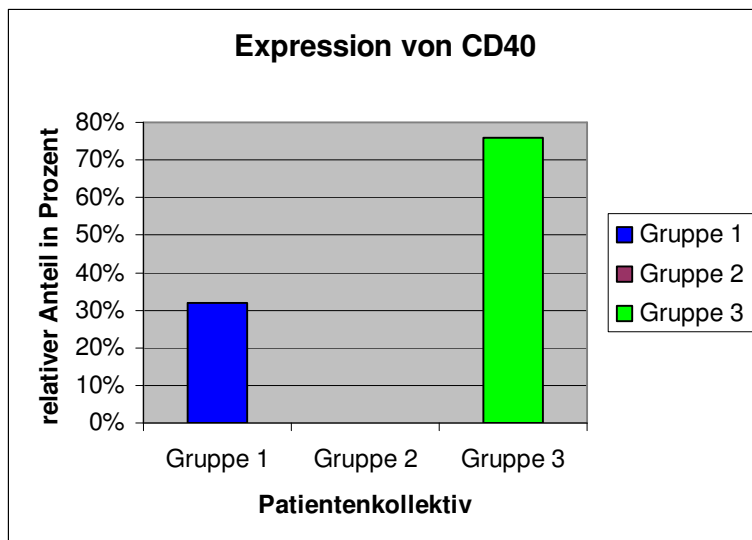
Patient	CD40
E2	5%

Tab. 4.29: Expression von CD40 in periimplantären Gewebeproben (CrCoMo-basierte Hüft-TEP);

#### **4.9.5 Zusammenfassung**

Patientenkollektiv	CD40
Gruppe 1	32%
Gruppe 2	0%
Gruppe 3	76%





Tab. 4.30 und Abb. 4.8: Übersicht über die Expression von CD40 bei den verschiedenen Patientenkollektiven;

Die periimplantären Gewebeproben weisen im Vergleich mit Gruppe 1 und 2 einen beachtlichen Anteil an CD40+ Makrophagen auf. Dies dürfte einer ausgeprägten Aktivierung von Makrophagen entsprechen, möglicherweise Partikel-induziert.

#### 4.10 Nachweis von Ki-67+ T-Zellen mittels Doppelfärbung für A59

Da noch Gewebe zur weitergehenden Untersuchung zur Verfügung stand, wurde das Präparat A59 für einen Doppelfärbungsansatz herangezogen. Zum Nachweis des in Proliferation befindlichen T-Zellanteils wurde entsprechend dem vorab beschriebenen Protokoll einer Doppelfärbung mit Antikörpern gegen CD3/Ki-67 durchgeführt. Das Ergebnis zeigt die folgende Abbildung.

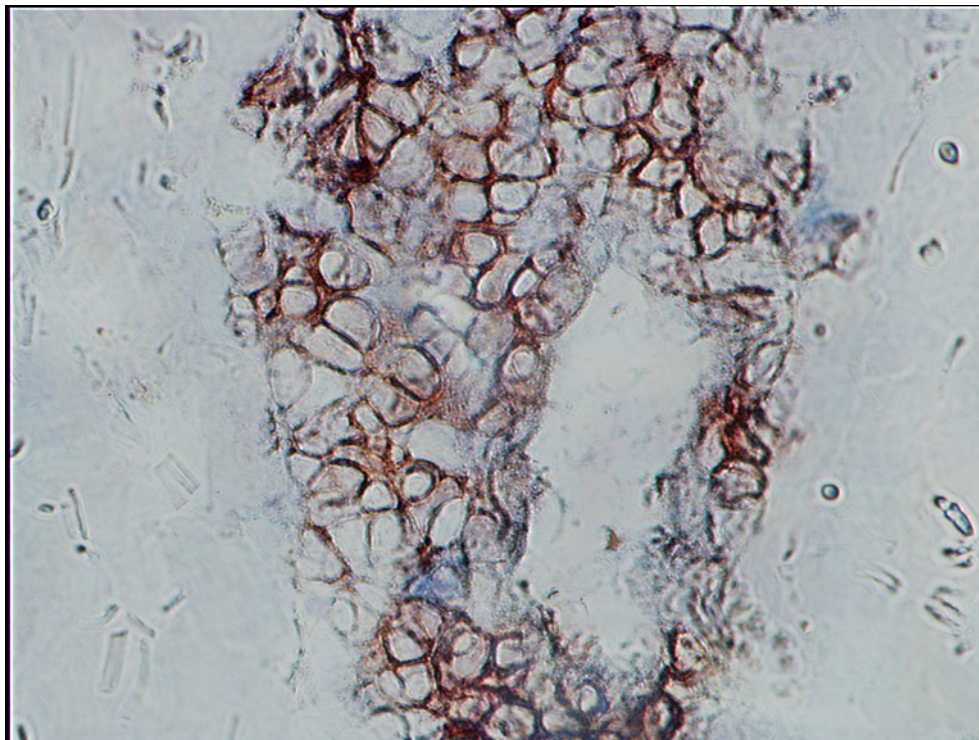


Bild 20: Immunhistologische Darstellung von CD3+(rot)/Ki67+(blau) Zellen im dermalen Infiltrat bei einem Patienten mit Nickelallergie (A59); Doppelfärbung; Vergrößerung: 400-fach;

Die rot/blau-gefärbten Zellen entsprechen proliferierenden T-Zellen (CD3+/Ki67+).

#### **4.11 Nachweis von aktivierten IL-2-R+ T-Zellen für A59**

In einer weiteren Färbereihe wurde das Präparat A59 zum Nachweis des Anteils der aktivierten (IL-2R+) Zellen innerhalb der CD3+ T-Lymphozyten einer Doppelfärbung CD3/IL-2R unterzogen. In Abbildung ist der Nachweis von IL-2R+T-Zellen gezeigt.

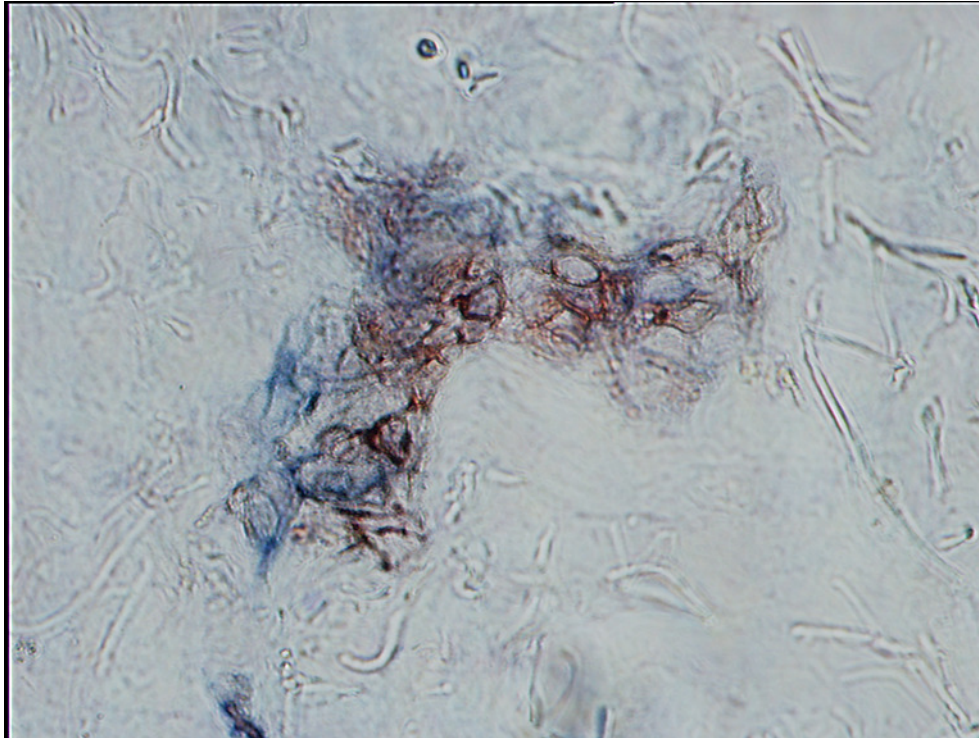


Bild 21: Immunhistologische Darstellung von CD3+(rot)/IL-2R+(blau) Zellen im dermalen Infiltrat bei einem Patienten mit Nickelallergie (A59); Doppelfärbung; Vergrößerung: 400-fach;

## **5 DISKUSSION**

Im täglichen Leben besteht häufig Kontakt mit Metallen. Dabei können sich sowohl im Beruf als auch im Privatleben Überempfindlichkeitsreaktionen vom Spättyp (Ekzemtyp) entwickeln. Nickel ist dabei das häufigste kutane Kontaktallergen. Auch in tieferen Gewebebereichen kann Metallkontakt bestehen – beispielsweise über Osteosynthesematerialien oder Endoprothesen. Hier sind allerdings noch viele Aspekte einer möglichen Allergie-bedingten Metallunverträglichkeit ungeklärt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen in Zusammenschau mit der gängigen Literatur diskutiert.

### **5.1 Mechanismen der Spättypallergie am Beispiel des Kontaktekzems durch Nickel**

Das allergische Kontaktekzem ist eine T-Zell-vermittelte Erkrankung, deren Immunmechanismus als Typ-IV-Reaktion nach Coombs und Gell eingestuft wird. Die beim Epikutantest durch das Aufbringen des Allergens induzierte Ekzemreaktion ist bei entsprechender Sensibilisierung sozusagen im Sinne eines Provokationstests an der Haut entstanden. Im Falle von Nickel wird angenommen, dass



allergenspezifische T-Zellen aus den Blutgefäßen in den Epikutantestbereich auswandern. Zu den Pathomechanismen der Auslösephase gehören Zytokinsignale für die Induktion/Hochregulation von Adhäsionsmolekülen, Chemokinwirkung und Homingstrukturen auf T-Zellen, proentzündliche Zytokine, zytotoxische Effekte von CD8+ Zellen und schließlich auch gegenregulatorische teils TH2-artige CD4+ Lymphozyten.

In unseren Analysen wiesen alle Gruppen ein CD3+ Zellinfiltrat auf, wobei CD4+ Zellen gegenüber CD8+ Zellen im Durchschnitt stets dominierten und CD20+ Zellen nur vereinzelt auftraten. In geringer Ausprägung waren T-Lymphozyten auch in Biopsien aus Nickel-exponierter, klinisch aber reaktionsloser Haut („Nicht-allergische“ Personen, Gruppe 2) zu finden.

Dabei war das zelluläre Infiltrat in den uns vorliegenden Ni-ECT-Gewebeproben ähnlich dem Infiltrat in den periimplantären Gewebeproben mit Ekzemreaktion gekennzeichnet durch CD3+ T-Lymphozyten mit einem starken Überwiegen der CD4-Antwort gegenüber der CD8-Antwort. Die B-zelluläre Reaktion erschien angesichts des vergleichsweise geringen Nachweises insgesamt eher nur von untergeordneter Bedeutung. Der Gehalt an CD14+-Zellen erwies sich in den Gruppen 1 und 2 als sehr ähnlich.

In unseren Analysen dominierten in den Ni-ECT-Arealen mit Ekzemreaktion der Patienten mit vorbekannter Ni-Allergie (Gruppe1) CD45RO+ Memory-Zellen deutlich gegenüber den naiven CD45RA+-Zellen in allen Fällen mit einem deutlich erhöhten Gehalt an CD45RO+-Zellen im Vergleich zu den Gewebeproben der Patienten ohne Nickelkontaktallergie.

Die proliferative Aktivität des Zellinfiltrats (gekennzeichnet durch Ki67+-Zellen) war in der Gruppe1 ebenso vergleichsweise etwas erhöht.

Die Resultate der Gruppe 1 entsprechen der in der Literatur beschriebenen charakteristischen Zusammensetzung des Zellinfiltrats im Sinne einer Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp, wie sie für das allergische Kontaktekzem typisch ist.

### **5.1.1 Die Rolle von CD3+/CD4+/CD8+/Memory-Zellen beim allergischen Kontaktekzem**

Kontakt-Ekzeme können entweder toxisch-irritativ oder immunologisch bedingt sein und verlaufen anfangs selbstlimitierend – außer der Kontakt zu dem Auslöser läuft weiter.

Das klinische Bild kontaktallergischer Reaktionen variiert sehr mit der Art des Allergens, Ort und Dauer der Einwirkung sowie individueller Faktoren einschließlich Grad der Sensibilisierung. Eine akute allergische Kontaktdermatitis kann Ödem, Erythem, Bläschen, nässende Areale und schließlich eine Abheilung unter Schuppung umfassen. Ein chronisch allergisches Kontaktekzem erscheint oft als lichenifizierte, entzündlich verdickte Haut mit Einrissen, Rötung und Juckreizbedingten Kratzspuren. Beide Formen haben die Neigung zu Streuherden.

Histologisch sind bei einer akuten Reaktion typischerweise erweiterte Gefäße und perivaskuläre Infiltrate aus Lymphozyten, vereinzelt auch Neutrophilen und Eosinophilen zu sehen. In der Epidermis führt ein interzelluläres Ödem zu schwammartiger Epidermisauflockerung und es zeigt sich eine Einwanderung von Lymphozyten. Ähnlich ist auch das Bild einer nach drei Tagen biopsierten Epikutantestreaktion. Bezüglich des lymphozytären Infiltrats überwiegen die CD4+-Lymphozyten die CD8+-Lymphozyten. Auch antigenpräsentierende CD1+-Langerhans-Zellen sowie Makrophagen sind in Epidermis und Dermis erkennbar.

Das allergische Kontaktekzem setzt eine Sensibilisierung voraus, wobei beim Sensibilisieren oft schon geringe Allergenmengen gewöhnlich innerhalb von 24 - 48 Stunden eine allergische Kontaktreaktion auslösen.

Nickel führt die Hitliste der häufigsten Kontaktallergene an.

Haptene wie Nickel sind als niedermolekulare, chemisch definierte Substanzen mit einem Molekulargewicht von meist unter 1kDa aufgrund ihrer zu geringen Größe selbst nicht in der Lage, eine Immunantwort zu induzieren, sondern müssen zuerst durch meist kovalente Bindung an normale Körperproteine Hapten-Carrier-Proteine bilden, die dann als Allergene wirksam sind. Gemäß Untersuchungen des Max-Planck-Instituts für Immunbiologie, Freiburg fungieren Metall-Ionen wie Nickel-Ionen als nicht-klassische Haptene: Das heißt, Nickel-Ionen gehen nur in seltenen Fällen kovalente Bindungen ein, vielmehr bilden sie reversible Komplexe mit der MHC/Peptid-Zelloberfläche aus. Als Nickel-bindende Proteine können dabei u.a. Humanalbumin oder Transferrin fungieren, jedoch auch zahlreiche Hitze-Schock-Proteine und chaperones, was möglicherweise ein Hinweis ist für eine funktionelles Zusammenwirken von Nickel mit diesen Stress-Proteinen - eine potentielle, aber noch nachzuweisende Erklärung für die außerordentliche Bedeutung von Nickel als Allergen (Thierse et al. 2004) (Thierse, Gamerding, Junkes, Guerreiro & Weltzien, 2005), (Fritsch, 1998, 161-170).

Während der Sensibilisierungsphase werden die Antigene durch primäre antigenpräsentierende Zellen – in der Epidermis CD1+ Langerhans-Zellen – über die afferenten Lymphbahnen in die parakortikalen Zonen der regionären Lymphknoten transportiert. Hier präsentieren diese interdigitierenden Zellen prozessierte Hapten-Protein-Konjugate mit Klasse II-HLA-DR-Molekülen gegenüber CD4+-Lymphozyten, was zur Ausbildung einer Population von „Memory“-CD45R0+-T-Zellen führt. Wird nun diesen Gedächtniszellen erneut das aufbereitete Hapten-Protein-Konjugat präsentiert, so kommt es sowohl zu einer Aktivierung des Transduktions-CD3-Rezeptor der T-Zellen als auch zur Freisetzung von Zytokinen wie IL-2, IL-3, IFN- $\gamma$  und GM-CSF. In dieser Auslösephase einer allergischen Reaktion vom Ekzempyp sorgen Chemokine/vaskuläre Adhäsionsmoleküle für eine erleichterte T-Zell-Einwanderung in die Haut.

Dabei induziert IL-2 auch als autokriner Mechanismus die Proliferation der T-Zellen, welche IL-2-Rezeptoren exprimieren.

INF- $\gamma$  und TNF induzieren ca. 24 – 48h nach Antigenkontakt die Expression interzellulärer Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 durch epidermale Keratinozyten, was wiederum ein natürlicher Ligand für das vorwiegend auf Lymphozyten und Makrophagen exprimierte Integrin LFA-1 ist und somit für die Anlockung von T-Zellen und Makrophagen in der Epidermis von entscheidender Bedeutung ist.

Nach 48 – 72h ist in der Regel eine Abschwächung der Reaktion zu erkennen, wobei die Produktion von Prostaglandin E (PGE) durch Makrophagen und Keratinozyten, welches die IL-1- und IL-2-Produktion hemmt, die Bindung von T-Zellen an aktivierte Keratinozyten und der enzymatische Abbau des Haptenkonjugats zu dieser „down-regulation“ beitragen (Roitt, Brostoff & Male, 1995, 310-313) .

In den Stanzbiopsien aus Nickel-Testfeldern bei Nickel-allergischen Personen fanden wir dementsprechend dichte, oft perivaskuläre T-Zell-Infiltrate. Dies waren meist mehr CD4+ als CD8+ Zellen. Die Expression von CD45R0 als Hinweis auf bereits sensibilisierte memory-Typ T-Zellen überzog ebenfalls im Vergleich mit CD45RA („naive“ Zellen). Zusätzlich fand sich als Hinweis auf die T-Zell-Aktivierung eine Expression von IL-2-Rezeptor (im Mittel 24% der Zellen) und auch von CD69 (im Mittel 19% der Zellen)(siehe 5.1.3). Auffällig war, dass auch in der Gruppe 2, d.h. bei den Biopsien aus klinisch nicht-reaktiver Nickel-exponierter Haut („nicht-allergische

Personen“) wenn auch gering ausgeprägt T-Zell-Infiltrate sichtbar waren. Hier fehlte allerdings bei fast allen Proben die IL-2R-Expression und es ergab sich auch eine nur geringe CD69-Expression (im Mittel 7%). In geringem Maße waren CD45RO- und CD45RA-Expression nachweisbar. Der Nachweis von T-Zellen auch in klinisch nicht auffälligen Ni-ECT-Arealen könnte für deren mögliche Rolle als regulatorische T-Zellen in der Gruppe 2 (Patienten ohne Nickelallergie) sprechen.

### **5.1.2 Die Bedeutung von Adhäsionsmolekülen**

Hinsichtlich der Expression von Adhäsionsmolekülen ergaben unsere Analysen, dass ICAM-1 in beträchtlichem Ausmaße in der Gruppe der Patienten mit Nickelkontaktallergie und in den periimplantären Gewebeproben nachweisbar war. Ein Nachweis von CD62E war ebenso nur in den Gewebeproben dieser beiden Gruppen, speziell bei Gruppe 1, möglich, nicht jedoch für die Patienten ohne Nickelallergie der Gruppe 2.

Adhäsionsmoleküle und die Aktivierung des Gefäßendothels sind neben der Sensibilisierungsphase vor allem wichtig für die Auslösephase der kontaktallergischen Reaktion.

So ist die Wanderung der naiven T-Zellen durch die Lymphknoten, ihre Aktivierung und Effektorfunktion von Adhäsionsmolekülen abhängig, nämlich den Selektinen, den Integrinen und einigen mucinähnlichen Molekülen.

Selektine sind auch maßgeblich am „homing“ der T-Lymphozyten, d.h. dem Erreichen ihres Bestimmungsortes, beteiligt sind. Sie finden sich auf Leukozyten (L-Selektin, CD62L) oder auf dem vaskulären Endothel (P-Selektin, CD62P und E-Selektine, CD62E).

Integrine gewährleisten die Adhäsion zwischen Zellen und zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix bei der Immunantwort. Insbesondere LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) gilt als das wichtigste Integrin für die Aktivierung sowohl naiver als auch reifer T-Zellen. Dieses bindet an drei interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAMs) ICAM-1 und ICAM-2, die beide sowohl auf Endothel als auch auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden und den T-Zellen die Wanderung durch die Blutgefäßwände ermöglichen, und ICAM-3 auf Leukozyten, das vermutlich in hohem Maße für die Interaktion zwischen antigenpräsentierenden Zellen und T-Lymphozyten verantwortlich ist. An der Anheftungsreaktion scheinen auch andere Moleküle wie CD2 auf der T-Zelle und LFA-3 auf der antigenpräsentierenden Zelle beteiligt zu sein. Da dendritische Zellen auf ihrer Oberfläche nicht nur das costimulierende Molekül B7 exprimieren, sondern auch die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ICAM-2, LFA-1 und LFA-3, gelten sie demnach im allgemeinen auch als die stärksten Aktivatoren naiver T-Zellen (Roitt, 1994, 163-166) (Roitt, Brostoff & Male, 1995, 95-100) (Keller, 1994, 136-142) (Janeway & Travers, 1997, 244-247). Die erhöhte Expression von E-Selektin speziell in Proben der Gruppe 1 deutet darauf hin, dass hier CLA<sup>+</sup> T-Lymphozyten über einen längeren Zeitraum in die Haut einwandern konnten. Dass eventuell auch „unspezifisch“ ein gewisses Zellinfiltrat zustande kommt, könnte auf direkter Wirkung von Nickel auf das Gefäßendothel beruhen.

Entsprechend Untersuchungen der Universität Münster können Nickel- und Kobaltchlorid auch direkt die Expression von Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) und Endothelial Leukocyte

Adhesion Molecule (ELAM-1) durch Endothelzellen induzieren (Goebeler, Meinardus-Hager, Roth, Goerdt & Sorg, 1993).

Auch die in Antwort auf irritative Signale entstehende Mediatoren-Produktion von Keratinozyten könnte einen Beitrag zur Lymphozyteneinwanderung in die Nickel-exponierte Haut geleistet haben.

### **5.1.3 Die Bedeutung von CD69, Interleukin-2 und seinem Rezeptor**

In der Gruppe 1 war in allen Proben die Expression von IL-2-Rezeptor als klassischer Aktivierungsmarker der T-Zellen nachweisbar, ebenso wie CD69.

Letzterer gilt als der am frühesten induzierbare Aktivierungsmarker auf T-Zellen, aber auch auf natürlichen Killerzellen und B-Zellen und führt zu einer erhöhten Genexpression von IL-2 und INF- $\gamma$ , einer verstärkten Expression von CD25 und letztlich zu einer IL-2 abhängigen T-Zell-Proliferation (Cebrian et al., 1988) (Testi, Phillips & Lanier, 1989).

Die zentrale Rolle des IL-2-Rezeptors ist in der Literatur vielfach beschrieben worden.

Trifft eine naive T-Zelle erstmals auf ein spezifisches Antigen in Gegenwart des notwendigen kostimulierenden Signals, so induziert dieser Vorgang, der auch als „priming“ bezeichnet wird, den Eintritt der T-Zelle in die G1-Phase des Zellzyklus und die Synthese von IL-2 sowie der  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors. Dieser setzt sich aus drei Ketten -  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  - zusammen, wobei ruhende T-Zellen nur eine aus  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette aufgebaute Form des IL-2-Rezeptors mit geringer Affinität bilden. Aktivierte Zellen exprimieren schließlich durch die Verbindung von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette mit der  $\alpha$ -Kette einen hochaffinen Rezeptor. Nach der Bindung von IL-2 an diesen Rezeptor kann die aktivierte Zelle den Rest des Zellzyklus durchlaufen, proliferieren und unter dem Einfluss von IL-2 zur T-Effektorzelle differenzieren. Dabei kommt es auf der T-Zelloberfläche auch zur Expressierung des Moleküls CD40-Ligand, das an das Oberflächenmolekül CD40 der B-Zelle bindet, was wiederum die Expression der kostimulierenden Moleküle B7.1 und B7.2 auf der Oberfläche der B-Zelle induziert und somit die zelluläre Immunantwort vorantreibt.

Damit IL-2 als Wachstumsfaktor produziert wird, ist die Interaktion von „B7“ und CD28 nötig. Durch diese Kostimulation wird die IL-2-Synthese deutlich gesteigert.

Durch IL-2 wird nun die klonale Expansion der aktivierten T-Zellen und ihre Differenzierung in Effektorzellen induziert, die dann im Vergleich zu naiven Zellen bei erneutem Antigenkontakt keiner Kostimulation mehr bedürfen und außerdem mehr LFA-1 und CD2 auf der Zelloberfläche exprimieren. Naive CD8<sup>+</sup> - T-Zellen differenzieren zu cytotoxischen T-Zellen, CD4<sup>+</sup> - T-Zellen entweder zu TH1- oder zu TH2-Zellen. Hier haben das Zytokinumfeld, Kostimulatoren und die Art der Peptid-MHC-Interaktion wesentlichen Einfluss. TH1-Zellen stehen hier für zellvermittelte Immunreaktionen.

( Roitt, 1994, 163-166) ( Roitt Brostoff & Male, 1995, 95-100) (Janeway & Travers, 1997, 255-257)

Die vor allem in den Biopsien aus Nickel-reaktiven, d.h. Ekzem-entwickelnden Testarealen erkennbare IL-2R-Expression weist auf die nach Allergen (Nickel-) Applikation erfolgte T-Zellexpansion. Die Biopsien erfolgten in einer relativ frühen Phase (Tag 3 nach Epikutanteststart), sodass auch CD69 als früher Aktivierungsmarker noch erkennbar war. Wie aus dem Zusammenhang in 4.6.5. ersichtlich, hatte sich in der Kontrollgruppe 2 nahezu keine IL-2R-Expression gezeigt. In den über Jahre Metall-exponierten periimplantären Geweben (Gruppe 3) war

ebenfalls nur eine geringe IL-2R- und CD69-Expression sichtbar – mit Ausnahme der Probe E2, wobei hier auch klinisch eine höhere Entzündungsaktivität vermutet war (siehe 4.6.2.).

#### **5.1.4 Zellproliferation als möglicher Hinweis auf Antigen-induzierte Aktivierung**

Betrachtet man Schnittpräparate der Hautbiopsien, so ist proliferative Aktivität in den basalen Teilen der Epidermis, den Haarwurzeln und im T-zellulären Infiltrat zu erwarten. Wie unter 4.7. beschrieben, ließ sich speziell im dermalen lymphozytären Infiltrat über die Färbung von Ki67 bei Proben nickelallergischer Patienten Proliferationsaktivität feststellen. Zu der Proliferation innerhalb des T-lymphozytären Infiltrats beim allergischen Kontaktekzem passt die gefundene IL-2R-Expression. Hier ist der oben beschriebene auto- und parakrine Wachstumsfaktor IL-2 als Produkt aktivierter T-Lymphozyten entsprechend zu erwarten. In den klinisch reaktionslosen Kontrollgeweben war auch nur geringe Proliferationsaktivität über Ki67-Expression zu sehen – im Gegensatz zur ebenfalls erhöhten Expression in den periimplantären Gewebeproben. Man könnte sich hier über persistierenden Antigenkontakt (Metallkorrosion) einen persistierenden „Entzündungs“-bedingten Proliferationsstimulus vorstellen.

#### **5.1.5 Die Rolle von CD45RA+ und CD45RO+ T-Zellen**

Die Interaktion zwischen „cutaneous lymphocyte-associated antigen“ (CLA) und E-Selektin auf Endothelzellen wird als wichtigste Schiene zur Einwanderung von T-Zellen in entzündete Hautareale gesehen (Moed et al., 2004). Die CLA-Expression ist wiederum nach Antigenexposition am höchsten und wird deshalb speziell bei CD45RO+ Zellen (memory T-Zellen) gesehen (Robert & Kupper, 1999).

Ende der 80er Jahre wurde das CD45-Antigen als potentieller Marker für memory-Zellen beschrieben. Die CD45R-Isoform mit niedrigerem Molekulargewicht (CD45R<sub>low</sub> oder CD45RO) wurde wegen ihrer Assoziation mit T-Zellantwort auf Antigene als memory-Marker definiert (Bell, Sparshott & Bunce, 1998).

Auch wenn inzwischen Übergänge zwischen CD45RA und CD45RO im Hinblick auf memory-Funktion beschrieben sind, so wurde in der vorliegenden Arbeit die CD45RO-Expression als Haupthinweis auf memory T-Zellen gewertet.

Bei den immunhistologischen Untersuchungen war CD45RO-Expression speziell in Präparaten der Gruppe 1 nachweisbar, in klinisch reaktionsloser Haut gering zu sehen und wiederum deutlich mehr in den periimplantären Gewebeproben. Welche memory-Effektor-Funktion damit verknüpft ist, muss in unserer Untersuchung offen bleiben. Allerdings ergibt sich damit der Hinweis auf Antigen-(memory)-Reaktivität auch in periimplantärem Gewebe.

#### **5.1.6 Die Rolle von CD40**

Während eine Antigenpräsentation in Abwesenheit von kostimulatorischen Signalen eher zu einer Anergie von (naiven) T-Zellen führt, kann über Interaktion von CD40 und CD40-Ligand eine starke T-Zell-Hilfe induziert werden.

Wir fanden eine zwar individuell schwankende, aber meist hohe CD40-Expression in Gewebeproben der Gruppe 1 und 3. CD40 kann auf dendritischen Zellen/Makrophagen, aber auch auf B-Zellen vorkommen. In unseren Gewebeproben

ließen sich nur sehr wenige B-Zellen nachweisen, sodass wir von einer vornehmlichen CD40-Expression auf dendritischen Zellen/Makrophagen ausgehen. CD40-Hochregulation geschieht in einem IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ -reichen Umfeld.

Wenn nun Antigen-aktivierte T-Zellen mit erhöhter CD40-Ligand-Expression auf CD40-tragende Antigen-präsentierende Zellen treffen, wird eine TH1-Antwort zusätzlich verstärkt und die Makrophagenaktivierbarkeit durch IFN- $\gamma$  erhöht (Casamayor-Palleja, Khan & MacLennan, 1995).

Durch die erhöhte CD40-Expression würde über eine zu vermutende CD40-CD40L-Interaktion die allergische Entzündung verstärkt.

Aktivierte Makrophagen können nun effektiver Lysosomen mit Phagosomen verschmelzen und lysosomale, bakterizide Enzyme, Sauerstoffradikale und über die durch INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  induzierte iNOS ( induzierbare NO-Synthase ) Stickstoffoxid sowie antimikrobielle Peptide bilden. Außerdem werden vermehrt MHC-Klasse II-, B7-, CD40-Moleküle und TNF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimiert, was die Antigenpräsentation für naive T-Zellen, die Rekrutierung neuer Effektorzellen und somit insgesamt die zelluläre Immunantwort verstärkt. Jedoch ist eine exakte Regulierung der Aktivierung notwendig, um die lokale Schädigung des Wirtsgewebes zu minimieren. Diese wird zum einen dadurch gewährleistet, dass erst durch spezifische Rezeptorstimulation der TH1-Zelle diese zur Transkription der Zytokingene angeregt wird und die erforderlichen Oberflächenmoleküle und Zytokine de novo synthetisiert werden und zum anderen dadurch, dass die Sekretion von IFN- $\gamma$  sehr genau auf die Zielzelle ausgerichtet ist und darüber hinaus die Zytokinproduktion mit abbrechendem Kontakt der T-Zelle mit dem („infizierten“) Makrophagen ebenso sofort unterbunden wird. Als charakteristische Zytokine der TH1-Zellen gelten IL-2, IL-3, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  und GM-CSF (Roitt, 1994, 177-178) (Roitt, Brostoff & Male, 1995, 106-107) (Keller, 1994, 145)(Janeway et al., 1997, 277-281).

Bei der Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ ist in der Literatur die vorherrschende Rolle der TH1-Antwort vielfach beschrieben worden (Roitt, 1994, 177-178) (Roitt, Brostoff & Male, 1995, 106-107) (Keller, 1994, 145)(Janeway & Travers., 1997, 277-281).

### **5.1.7 Immunologische Toleranz**

Die T-Zell-Toleranz gegenüber Antigenen erfolgt in Form von Anergie, Toleranz und aktiver Suppression.

Da in unseren Untersuchungen der Aspekt „regulatorische T-Zellen“ nicht berücksichtigt wird, soll dies hier nur knapp erwähnt werden.

Am Beispiel der oralen Toleranz wurde gezeigt, dass niedrigere Dosen eher Suppression fördern und hohe Antigen-Dosen klonale Anergie/Deletion.

Als Mechanismen wurden TH2-Typ (IL-4/IL-10) und TH3-Typ (TGF- $\beta$ ) regulatorische T-Zellen wie auch CD4+ CD25+ regulatorische Zellen beschrieben (Faria & Weiner, 2006).

Anergie bedeutet hier ein hyporesponsiver Zustand mit bei Restimulation beeinträchtigter IL-2-Produktion und Proliferation (Schwartz, 2003).

In nicht-allergischen Individuen können regulatorische T-Zellen die Entzündung verhindern, zur Ausheilung führen, bzw. einem unkorrekten Remodeling und einer Chronifizierung vorbeugen. So können beispielsweise antigenspezifische Tr1-Zellen über die Produktion von IL-10 und TGF- $\beta$  eine T-Zelltoleranz induzieren, die IgE-Produktion unterdrücken, Mastzellen, Basophile und Eosinophile direkt supprimieren,

TH2-Zellen durch Behinderung der TH2-Zytokinproduktion (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9) inhibieren und ihre Migration erschweren. (Akdis CA, Blesken, Akdis M, Wuthrich & Blaser, 1998), (Jutel et al., 2003).

Die Verknüpfung von „memory“- und regulatorischen T-Zellpopulationen wird ebenfalls postuliert (Akbar, Vukmanovic-Stejic, Taams & Macallan, 2007) und könnte auch eine Rolle bei der Verträglichkeit von Metallimplantaten im Körper spielen.

## **5.2 Metallimplantatunverträglichkeit**

Weltweit steigt die Zahl implantierter künstlicher Hüftgelenke mit sinkendem Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation. Entsprechend wird auch die Anzahl von Revisionsoperationen wegen aseptischer Prothesenlockerung zunehmen. Bisher gibt es zur möglichen Rolle von Überempfindlichkeitsreaktionen weder epidemiologische Daten noch geklärte Pathomechanismen (Baur et al., 2005) (Korovessis, Petsinis & Repanti, 2003) (Semlitsch, Streicher und Weber, 1989).

In dieser Arbeit wird das periimplantäre Gewebe von Patienten mit unzementierten CrCoMo-basierten Hüfttotalendoprothesen (5xTyp ESKA, 1xMetasul, Fa. Centerpulse, Zimmer) untersucht, welches im Rahmen einer aufgrund von aseptischer Implantatlockerung durchgeführten Revisionsoperation gewonnen wurde. Klinisch gaben die 6 Patienten (5 Männer, 1 Frau; Alter 32-71Jahre) vor der Operation vor allem Schmerzen im Bereich der Hüfte mit Bewegungseinschränkung an. Die periimplantären Gewebe wurden (immun-) histologisch im Hinblick auf Zeichen einer T-zellulären Immunreaktion analysiert. Als Vergleich dienten Biopsien aus Ni-Epikutantestarealen bei nicht-allergischen und allergischen Personen. Leider konnte bei den Implantatträgern keine Epikutantestung zur Frage einer Metallallergie durchgeführt werden.

### **5.2.1 Arten von Endoprothesen**

Als Hüft-Totalendoprothesen werden heutzutage Metall-Metall-Gleitpaarungen verwendet oder Keramik-Keramik-Gleitpaarungen oder Metall in Kombination mit Polyethylen. Die Metall-Metall-Gleitpaarungen erleben gerade aufgrund von guten Langzeitergebnissen eine Renaissance (Weber BG, 1996) (Hilton, Dorr, Wan and McPherson, 1996).

Die am häufigsten verwendeten Materialien orthopädischer Implantate sind rostfreier Stahl und Cobalt-Chrom-Legierungen.

Rostfreier Stahl enthält üblicherweise mindestens 10 – 14% Nickel, mindestens 12% Chrom (Kanerva & Förström, 2001) und oft auch Mangan, Magnesium, Cobalt, Kupfer und Molybdän sowie zu weniger als 1% Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor, Schwefel und Silikon. Dabei enthält der als Implantat- bzw. Prothesenmaterial eingesetzte rostfreie Stahl normalerweise 9 – 14%, jedoch zum Teil auch bis zu 35% Nickel, bis zu 20% Chrom, zu etwa 2 – 4% Molybdän und kleine Mengen an Mangan (Kubba et al., 1981).

Vitallium besteht in geschmiedeter Form zu 9 – 10%, in Gussform zu ca. 2,5% aus Nickel und ansonsten hauptsächlich aus Kobalt und Chrom (Samitz & Katz, 1975).

Für Hüftprothesen werden am häufigsten Kobalt-Chrom-Legierungen und Titan-Aluminium-Vanadium-Legierungen verwendet (Disegi & Eschbach, 2000). Die genaue Zusammensetzung der Legierungen wird festgelegt durch die International Organization for Standardization (ISO), 5832, -4, und-12 (Marti, 2000).



In dieser Arbeit wurden zwar nur 6 Implantatträger, dafür alle mit unzementierten Hüft-Totalendoprothesen auf CrCoMo-Basis analysiert.

### **5.2.2 Physikalische Charakteristika der Metall-Metall-Gleitpaarungen**

Die jährliche Abrasionsrate von Metall-Metall-Gleitpaarungen ist vergleichsweise gering und liegt bei 0,1-10µm für den Kopf und 0,2-6µm für die Pfanne. Die volumetrische Abriebrate beträgt 0,3mm<sup>3</sup>/Jahr und ist damit 60-250mal geringer als bei einer Polyethylen-Pfanne gegen eine CrCoMo-Kopf (17,9mm<sup>3</sup>/Jahr). Der Abrieb ist in den ersten beiden Jahren am größten und sinkt nach einer gewissen „Einlaufzeit“ („Running-in-Phänomen“) Dabei werden etwa 25nm große Metallpartikel freigesetzt (Doorn et al., 1996) (Korovessis et al., 2003) (McKellop et al., 1996) (Sieber, Rieker & Kottig, 1999).

Legierungskomponenten wie Chrom, Kobalt und Molybdän können freigesetzt werden mit nachweislich erhöhten Serumspiegeln von Kobalt und Chrom und noch ungeklärtem karzinogenem Potential. So konnte Masse im Rahmen einer Multi-Center-Studie eine 2fach erhöhte Kobalt-Serum-Konzentration, eine 10fach erhöhte Kobalt-Urinkonzentration, eine 1,5fach erhöhte Chrom-Serum-Konzentration und eine 3fach erhöhte Chrom-Urin-Konzentration durchschnittlich 6 Monate nach Implantation einer Metall-Metall-Hüft-Totalendoprothese feststellen ohne signifikante Erhöhung der Nickel-Blut-Konzentration (Masse et al., 2003). McDonald konnte ebenso eine durchschnittlich 7,9fach erhöhte Erythrozyten-Kobalt-Konzentration, eine 2,3fach erhöhte Erythrozyten-Chrom-konzentration, eine 35fach erhöhte Urin-Kobalt-Konzentration und eine 17,4fach erhöhte Urin-Chrom-Konzentration nachweisen (MacDonald et al., 2003) (Delaunay, 2000) (Schaffer, Pilger, Engelhardt, Zweymueller & Ruediger, 1999) (Doorn et al., 1996) (Gillespie et al., 1996) (Kreibich et al., 1996) (Visuri, Pukkala, Paavolainen, Pulkkinen & Riska, 1996).

Nickel und Kobalt werden nach heutigem Wissensstand dabei vorwiegend Albumin-gebunden (Merritt, Brown & Sharkey, 1984) (Yang & Black, 1994) rasch vom Gewebe ins Blut transportiert und im Urin ausgeschieden (Black, Maitin, Gelman & Morris, 1983) (Brown, Farnsworth, Merritt & Crowe, 1988a) (Brown, Merritt, Farnsworth & Crowe, 1988b) (Sunderman et al. (1989).

### **5.2.3 Einflussfaktoren für Metallimplantatunverträglichkeit**

#### **5.2.3.1 Immunogene Potenz von Implantatmaterialien**

Im Hinblick auf Metalle und Metall-Legierungen sei hier erwähnt, dass ein Kontakt mit Gewebeintegration (z.B. im Knochen) bei Titanimplantaten bzw. eine „Pseudomembran (Interface)“ sich als „Abkapselungsreaktion“ bei Edelstahl bzw. CrCo-Implantaten ausbilden kann. Je nach Oberflächenrauigkeit ist auch unterschiedliche Stimulierung von Kontaktgewebe oder Blutzellen (im Knochenmark) zu erwarten. Der Einsatz gold-beschichteter Stents zur Vermeidung von Thrombozytenadhäsion und Entzündungsantwort infiltrierender Makrophagen hat beispielsweise – entgegen der hohen Erwartung – sogar zu deutlich mehr Restenosierungen als bei Edelstahlstents geführt (Kastrati et al., 2000).

Selbstverständlich muss auch auf einen optimalen Sitz des Implantats, die Korrosions- und Abriebeigenschaften, Partikelpermanenz und Abnutzungserscheinungen, und somit das Ausmaß der Metallionenfreisetzung und Partikelbildung und die durch Partikelexposition erfolgte Makrophagenaktivierung

geachtet werden. Die Partikel-induzierte Makrophagenaktivierung bedingt eine unspezifischen Entzündung durch Phagozytose, Enzymfreisetzung, IL-1/IL-6-Produktion, Osteoklastenaktivierung, Fremdkörperreaktion, Knochenresorption und Gewebeumbau (Rodgers et al., 1997) (Glant et al., 1993) (Goldring, Flannery, Petrison, Evins & Jasty, 1990). Des Weiteren ist die Deposition von Metallpartikeln in lokalen Lymphknoten als möglicher Induktionsfaktor für eine Metallunverträglichkeitsreaktion zu berücksichtigen (Urban et al., 2000)(Willert et al., 1996). Noch ist ungeklärt, ob der sogenannte „low grade infect“ eine Adjuvanssituation für eine überschießende Immunantwort auf Metallimplantate sein kann.

### **5.2.3.2 Patienteneigene Faktoren**

Die sogenannten Immune response – Gene codieren unter anderem für die MHC-Klasse II-Moleküle auf B-,T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen, welche die für die T-B-Zellkooperation erforderlichen Interaktionen determinieren. Demnach lassen sich interindividuelle Unterschiede der Immunantwort auch auf Variationen der benannten Gene zurückführen. Eventuell könnte dies auch die Erklärung für eine „multiple drug hypersensitivity“ sein (Gex-Collet, Helbling & Pichler, 2005). Im Mausmodell gibt es Hinweise dafür, dass eine Überexpression des Transkriptionsfaktors T-bet eine Kontaktdermatitis bahnt. T-bet ist der spezifische Transkriptionsfaktor der die Immunantwort aktivierenden TH1-Zellen (Ishizaki et al., 2007).

Während Glucokortikoide und Androgene die Immunantwort unterdrücken, bewirken Östrogene, Wachstumshormon, Thyroxin und Insulin das Gegenteil. Entsprechend gilt Östrogen als der Hauptfaktor für die insgesamt stärker ausgeprägten Immunantworten von Frauen im Vergleich zu Männern – mit einem höheren Serumspiegel an Immunglobulinen und sezerniertem IgA, einer stärkeren Antikörperantwort auf T-Zell-abhängige Antigene, einer relativen Resistenz gegenüber T-Zelltoleranz und einer geringeren Infektanfälligkeit. Glucokortikoide, deren Sekretion einer circadianen Rhythmik unterliegt, werden durch eine Vielzahl von Stimuli wie Angst, Hunger, Trauma, extreme Temperaturschwankungen, Stress etc. freigesetzt und limitieren dadurch immunologische Reaktionen in Form einer Rückkopplungshemmung vor allem auf die Aktivität der TH1- Zellen.

Natürlich haben auch Ernährung, Training, Trauma, Grundkrankheiten, Medikamenteneinnahme und Alter Einfluss. Deren Wirkung auf Mechanismen der Spätypallergie wird aber nur in großen Studienkollektiven zu klären sein.

(Roitt, Essential Immunology, 207-214).

### **5.2.4 Klinische Bilder einer Metallimplantatallergie**

Mehrfach wurde nach Metallimplantation das Auftreten lokalisierter oder generalisierter Ekzeme beschrieben (Kubba et al., 1981) (Munro-Ashman & Miller, 1979) (Waterman and Schrik, 1985) (Carlsson, Magnussen & Möller, 1980), die sich nach Implantat-Entfernung besserten oder gar verschwanden.

Auch Urtikaria nach Metallimplantation wurden beschrieben (McKenzie, Aitken & Risdill-Smith, 1967).

Ebenso wurden Wundheilungsstörungen im Zusammenhang mit Metallimplantatunverträglichkeit diskutiert (Rodgers et al., 1997).

Eine Kontaktsensibilisierung durch Metallimplantate scheint möglich, worauf nach Implantateinbringung durchgeführte Epikutanteste hinweisend sind (Gawkrödger,

1993) (Waterman & Schrik, 1985). Ähnliches gilt für Körperpiercings (Ehrlich, Kucenic & Belsito, 2001).

Darüber hinaus wurde berichtet über auf rostfreien Stahldraht zurückzuführende, sterile Osteomyelitis (Hayashi et al., 1999), die sich histologisch als granulomatöse Entzündung mit epitheloidzelligen Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen manifestierte.

Auch eine vermutlich auf einer Typ IV-Überempfindlichkeitsreaktion nach Gell und Combs basierende, aseptische Implantatlockerung (Munro-Ashman & Miller, 1976) wurde in diesem Zusammenhang beschrieben. In den 1970er Jahren wurden aufgrund von mutmaßlicher allergischer Reaktionen auf eine CrCo-basierte McKee-Farrar-Prothese (Benson, Goodwin & Brostoff, 1975) (Elves, Wilson & Kemp, 1975) Epikutantests durchgeführt mit einer höheren Sensibilisierungsrate bei Patienten mit gelockerten Hüfttotalendoprothesen als bei Patienten mit stabil verankertem Gelenkersatz (Agrup, 1968) (ASTM Book of Standards, Vol. 13. Philadelphia, ASTM 1995).

Möglicherweise beruhen auch persistierende Ödeme und Schmerzen im Bereich von Metallimplantaten auf einer Implantatunverträglichkeit. Jedoch sind angesichts der Sensibilisierungsraten von bis zu 13% der Bevölkerung gegen Nickel und von bis zu 5% gegen Kobalt und Chrom vergleichsweise wenige Fälle von Metallimplantatallergie beschrieben. Zusätzlich fehlen bisher noch epidemiologische Daten zur Metallimplantatallergie.

Meist wird rostfreier Stahl bei Frakturbehandlung/orthopädischen Implantaten als Auslöser von Unverträglichkeitsreaktionen beschrieben (Barranco & Soloman, 1972) (Cramers & Lucht, 1977) (Mayor, Merritt & Brown, 1980) (Merritt & Brown, 1996) (Merritt & Brown, 1981) (Merritt & Rodrigo, 1996) (Santavirta, Kontinen, Hoikka & Esola, 1991).

Auch im Zusammenhang mit CrCo-Legierungen werden allergische Reaktionen berichtet (Halpin DS, 1975) (Mayor, Merritt & Brown, 1980) (Mc Kenzie et al., 1967) (Merritt & Brown, 1981).

Die von Merritt et al. bei Patienten mit allergischen Reaktionen auf Kobalt-Chrom-Legierungen berichteten erhöhten IgE-Serumspiegel gegen die metallischen Komponenten von Hüftimplantaten hat bisher keine andere Arbeitsgruppe nachvollziehen können (Merritt and Brown, 1996).

Die Rolle des Epikutantests, des klassischen Tests zum Nachweis eines allergischen Kontaktekzems, ist bei der Abklärung von periimplantären Überempfindlichkeitsreaktionen unklar (Agrup, 1968) (Goh, 1986) (Menné & Nieboer, 1989) (Merritt & Brown, 1993). Vermutlich ist nur ein Teil der periimplantären metallallergischen Reaktionen auch über Hauttest erfassbar (Thomas, 2003).

In dem vorgestellten Patientenkollektiv der Gruppe 3 erfolgte leider weder prä- noch postoperativ ein Epikutantest.

Allgemein ist bezüglich der mechanisch-physikalischen Charakteristika von Endoprothesen festzuhalten, dass speziell bei Metall-Metall-Paarung durch Optimierung der Tribologie die Partikelgröße deutlich abgenommen hat – deren Disseminierung im Körper und deren Korrosions-bedingte Metalionenfreisetzung aber dadurch eher gefördert wird (Hughes, Brownn, Payer & Merritt, 1990) (Santavirta et al., 1991) (Steinemann, 1980).

### **5.2.5 Histologische Ergebnisse**

In den periimplantären Geweben der Gruppe 3 konnte ein CD3-T-Zell dominiertes lymphohistiozytäres Infiltrat nachgewiesen werden mit deutlichem Überwiegen der

CD4+- Zellen gegenüber den CD8+-Zellen. B-Zellen waren nur geringfügig nachweisbar.

Es konnten hierbei tendenziell etwas mehr aktivierte IL-2R-positive Zellen nachgewiesen werden als in der Gruppe 2, jedoch deutlich weniger als im Bereich der Ni-ECT-Areale mit Ekzemreaktion der Gruppe 1. Der Aktivierungsmarker CD69 war wie auch in der Gruppe 2 nur geringfügig nachweisbar.

Allerdings fand sich ähnlich der Gruppe 1 ein hoher Anteil an CD 45RO+- Gedächtniszellen, jedoch auch naive CD45RA+-T-Zellen waren im Vergleich zu Gruppe 2 vermehrt vorhanden.

Im Vergleich zu den Resultaten der Gruppe 1 fiel ein insgesamt deutlich höherer Anteil an CD14+-Zellen, d.h. Makrophagen auf (51% in der Gruppe 3 gegenüber 34% in der Gruppe 1) mit einem beträchtlichen Nachweis des Aktivierungsmarkers CD 40 (70% in der Gruppe 3 gegenüber 32% in der Gruppe 1 und 0% in der Gruppe 2). Dies kann auf die beschriebene Partikel-induzierte Makrophagenaktivierung in periimplantären Geweben hinweisen.

Ebenso fiel angesichts der vermehrten Expression von Ki 67 (20% in der Gruppe 3 gegenüber 9% in der Gruppe 1 und 5% in der Gruppe 2) eine insgesamt deutlich erhöhte proliferative Aktivität des Zellinfiltrats im Bereich periimplantärer Gewebe auf. Diese kann bedingt sein durch die Proliferation des entzündlichen Infiltrats (T-Zellen und Makrophagen) wie auch der gewebeeigenen Fibroblasten mit möglicherweise vermehrter Bindegewebsbildung.

Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 war in den periimplantären Gewebeproben wie auch in der Gruppe 1 der Patienten mit Nickel-Kontaktallergie deutlich exprimiert. Ein Nachweis von CD62E war ebenso nur in den Gewebeproben dieser beiden Gruppen möglich, nicht jedoch für die Patienten ohne Nickelallergie der Gruppe 2.

Somit waren bei den periimplantären Gewebeproben einige Charakteristika einer T-lymphozytären Entzündung in Anklang an die Gewebeproben aus Metall-(Nickel-) allergischen Hautarealen (Gruppe 1) erkennbar. Speziell bei Präparat „E2“ war auch ein deutliches Überwiegen von CD45RO+ Memory T-Zellen sichtbar. Detailliertere, zukünftige Untersuchungen sollen diese ersten Hinweise auf lymphozytär geprägte periimplantäre zelluläre Infiltrate weiter interpretieren helfen. Immerhin wurden Charakteristika einer Spättyp-Überempfindlichkeitsreaktion mit einer T-lymphozytär dominierten Immunreaktion im Bereich periimplantärer Gewebe bereits von mehreren Autoren gefunden (Thomas, Barnstorf & Summer)(Willert et al., 2000) (Thomas P, 2003). Willert beschrieb in seiner Arbeit über 14 Gewebeproben von revidierten Metall-Metall-Gleitpaarungen (teils zementiert, teils unzementiert, mit unterschiedlichen Prothesenmodellen) Zeichen einer chronischen Entzündung mit diffusen, perivaskulären und intramuralen Lymphozytenaggregationen (CD3+-T-Lymphozyten, neben CD20+ B-Zellen). Daneben fand er nur eine relativ milde Fremdkörperreaktion ohne signifikante Granulombildung (Willert et al., 2001).

In der Arbeit von Baur et al. wurde eine homogenere Studiengruppe von 13 Patienten mit Osteolysen/Gelenkinstabilität bei zementfreien Prothesen mit einer Metall-Metall-Gleitpaarung (Metasul) untersucht. Auch hierbei fanden sich in 10 Fällen perivaskuläre lymphozytäre Infiltrate als möglicher Hinweis für eine Sensibilisierung vom verzögerten Typ (DTH). Die Osteolysen bildeten sich nach Wechsel der Gleitpaarung und Ausräumung der Osteolyse dauerhaft zurück (Baur et al., 2005).

Ebenso postulierte Campbell in seiner Arbeit über periprothetisches Gewebe von 11 revidierten Metall-Metall-Gleitpaarungen Hinweise für eine Sensibilisierung histologisch wie auch immunhistochemisch. Neben einer Metallose in 6 Fällen fand

auch sie in allen Fällen eine lymphozytäre Infiltration. Berichtet wurde aber der Nachweis von CD20+-Zellen, jedoch nicht von T-Zellen (Campbell et al., 2001).

Korovessis beschrieb in seiner Arbeit über 6 revidierte Metal-Metall-Gleitpaarungen ausgeprägte Nekrosen der Synovia in allen Fällen neben einer diffusen lymphoplasmazellulären Infiltration (Korovessis P et al., 2003).

Außerdem sind Vaskulitiden mit perivaskulärer/intramuraler Lymphozyteninfiltration mit Fibrinexsudation berichtet worden (Vernon-Roberts & Freeman, 1976) (Elves et al., 1975).

Weiterführende Ansätze zur Charakterisierung des periimplantären „Zell-Milieus“ werden im Folgenden beschrieben.

### **5.2.6 Aseptische Prothesenlockerung-bisherige Erkenntnisse**

Nach aktuellen Schätzungen werden heutzutage ca. 1,5 Millionen künstliche Gelenke jährlich implantiert (Schwarz, Looney & O'Keefe, 2000). Der chirurgische Eingriff an sich gilt als einer der erfolgreichsten Prozeduren in der Medizin überhaupt, jedoch sind die Langzeitergebnisse oftmals limitiert durch das Auftreten aseptischer Prothesenlockerungen, wie sie auch unser Patientengut zeigte (Gruppe 3). Hierbei kommt es innerhalb von 5-10 Jahren zu einer chronischen Knochenresorption (periimplantäre Osteolyse) bis hin zur Prothesenlockerung (aseptische Lockerung) (Harris, 1995). Aktuell sieht man die aseptische Prothesenlockerung in einer Entzündungsreaktion auf Abriebpartikel der Implantate begründet (Goldring, Schiller, Roelke et al., 1983) (Goldring, Jasty, Roelke, et al., 1986) (Margevicius, Bauer, MacMahon, et al., 1994) (Horowitz, Doty, Lane & Burstein, 1993) (Jacobs, Sumner & Galante, 1993). Die Abriebpartikel werden phagozytiert durch Makrophagen und induzieren so die Ausschüttung einer Reihe von Zytokinen. Dies vermitteln letztlich die Entzündungsreaktion mit Rekrutierung und Aktivierung von Osteoklasten, Knochenresorption und eventueller Lockerung, wobei auch Zellen des erworbenen Immunsystems (T- und B-Zellen) beteiligt zu sein scheinen. Die Rolle der letzteren ist jedoch noch weitgehend unklar und Bestandteil laufender Studien.

Periimplantäre Membranen im Bereich aseptisch gelockerter Prothesen enthalten Fibroblasten, Makrophagen und auch in geringerer Anzahl T-Zellen (Goldring et al., 1983) (Goldring et al., 1986). Bis zu einer Milliarde Abriebpartikel pro Gramm Gewebe lassen sich in periimplantären Membranen finden, die im Rahmen von Revisionsoperationen gewonnen werden. (Margevicius et al., 1994) (Hirakawa, Bauer, Stulberg et al., 1996). Dieselben Gewebe produzieren außerdem eine Reihe von Mediatoren, die eine Knochenresorption durch Osteoklasten vermitteln, z.B. TNF-alpha, IL-1, IL-6 und Prostaglandine (Goldring et al., 1986) (Goodman, Chin, Chiou, et al., 1989) (Jiranek et al., 1993) (Chiba, Rubash, Kim & Iwaki, 1994) (Shanberg, Jacobs, Black, Galante & Glant, 1995).

Diese Faktoren induzieren das eigentliche Effektormolekül, „receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK) ligand“. Makrophagen als Vorläuferzellen der Osteoklasten sind nachweislich die Hauptquelle für dieses Molekül, wie es immunhistochemische und in vitro-Studien belegen (Crotti, Smith, Findlay, et al., 2004) (Gehrke, Sers, Morawietz, et al., 2003). Makrophagen können sich unter dem Einfluss von RANK-Ligand in Osteoklasten umwandeln. Auch Tiermodelle mit Mäusen unterstützen die Hypothese einer durch Abriebpartikel induzierten Osteolyse über NFkappaB-Aktivierung und TNF-alpha-Produktion (Merkel et al., 1999) (Schwarz et al., 2000) (Teitelbaum, Chen, Erdmann & Abu-Amer, 2002).

In-Vivo-Blockade von TNF-alpha führt in der Tat zu einem signifikantem Rückgang der Partikel-induzierten Osteolyse (Childs, Goater, O'Keefe & Schwarz, 2001a) (Childs, Goater, O'Keefe & Schwarz, 2001b), die Blockade des Signalwegs von RANK-Ligand mittels genetischer Ablation oder hochdosierter Behandlung mit RANK:Fc (10mg/kg/48h) verhindert Knochenresorption sogar komplett (Childs, et al., 2002).

Die genaue Rolle der T-Zellen bei der aseptischen Prothesenlockerung ist allerdings nach wie vor unklar. Mäuse mit Mangel an T-Zellen, B-Zellen und natürlichen Killerzellen entwickeln Partikel-induzierte Osteolyse genauso schnell wie Wildtypen (Taki et al., 2005). Abgesehen davon herrschen in periimplantären Membranen Fibroblasten und Makrophagen vor, T-Zellen sind vergleichsweise in kleiner Anzahl nachweisbar (Goldring et al., 1986). Allerdings konnte kürzlich eine neue IL-17 produzierende Untergruppe von T-Zellen identifiziert werden. IL-17 wird vorwiegend von Memory-Zellen produziert und führt synergistisch mit TNF-alpha zur Aktivierung der Fibroblasten-ähnlichen Synovialzellen (Miossec, 2003) (Kolls & Linden, 2004). IL-17-produzierende T-Zellen haben ein anderes Cytokin-Profil als TH1-/TH2-Zellen, mit Sekretion von IL-17, TNF-alpha und RANK-Ligand und interessanter Weise niedrigen Spiegeln von IFN-gamma und ohne Ausschüttung von IL-4 (Bettelli & Kuchroo, 2005). INF-gamma wird in der Literatur eine inhibierende Funktion auf Osteoklasten und somit eine Hemmung der Osteolyse zugeschrieben (Takayanagi et al., 2000). Jedoch bedarf es näherer Untersuchungen dieser Untergruppe von T-Zellen zur genaueren Einschätzung derer Rolle bei der aseptischen Implantatlockerung.

Allerdings gibt es in der Literatur wie bereits vorab erwähnt mehrere Hinweise für einen Zusammenhang zwischen aseptischer Implantatlockerung und einer auf dem Boden einer Metallimplantatunverträglichkeit ausgelösten Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ

Bereits in den 70er/80er Jahren fielen vermehrt positive Epikutantestreaktionen auf bei Patienten mit Implantatversagen (60%) gegenüber solchen mit gut funktionierenden Prothesen (25%)(Hallab, Merritt & Jacobs, 2001) (Willert et al., 2005) (Davies, Willert, Campbell, Learmonth & Case, 2005) (Park et al., 2005).

Willert untersuchte in seiner Arbeit periimplantäres Gewebe, welches im Rahmen von Revisionsoperationen von Zweitgenerations-Metall-/Metallprothesen gewonnen wurde. Histologisch fielen dabei neben einer milden Fremdkörperreaktion mit wenigen phagozytierten Partikeln in den Makrophagen vor allen Dingen auch perivaskuläre und diffuse lymphozytäre Infiltrate aus T-/B-Zellen und Plasmazellen auf –sogar bei Patienten mit geringfügiger Partikeldeposition. Davies verglich 25 Patienten mit Hüftprothesen aus Cobalt-Chrom-auf Cobalt-Chrom mit 9 Patienten mit Hüftprothesen aus Cobalt-Chrom-auf-Polyethylen und 10 Patienten mit Hüftprothesen aus Titan-auf-Polyethylen, welche sich ebenso allesamt Revisionsoperationen unterzogen. Perivaskuläre lymphozytäre Infiltrate im periimplantären Gewebe fanden sich in 17 von 25 Fällen von Patienten mit Metall-/Metall-Gleitpaarungen, jedoch in keinem Fall eines Polyethylen-/Metall-Implantats. Auch wurde bei den Metall-/Metall-Gleitpaarungen eine vergleichsweise deutlich erhöhte Anzahl von Blutgefäßen gefunden. Beide Arbeiten postulieren aufgrund des Nachweises eines perivaskulären Infiltrats aus T-/B-/Plasma-Zellen zum Zeitpunkt des Implantatversagens die Hypothese einer Überempfindlichkeitsreaktion.

Die neueste Arbeit von Park et al. beschreibt ebenfalls lymphozytäre Infiltrate in periimplantären Geweben von 9 Patienten, die sich Revisionsoperationen nach Metall-auf-Metall-Prothesen-Implantation unterzogen. Acht von diesen Patienten zeigten außerdem positive Reaktionen im Epikutantest (vier ++, vier +)(im Vergleich

zu 2 positiven Reaktionen (zwei +) bei den Kontrollen entsprechenden Alters und Geschlechts mit demselben Implantat-Typ ohne Osteolyse).

Dennoch gibt es bisher keine Evidenz für Metallallergie als Ursache für das lymphozytäre Infiltrat noch für einen Zusammenhang zwischen periimplantären lymphozytären Infiltrat und periprothetischer Osteolyse. Wenn Metallallergie Ursache der periimplantären Entzündungsreaktion und Osteolyse ist, bleibt unter anderem zu klären, wie oft eine kutane Metallallergie überhaupt mit einer periimplantären „Metall-Überempfindlichkeit“ korreliert ist.

Vermutlich lassen sich solche Fragen erst durch größere Studien, u.a. mit Ermittlung der Häufigkeit periimplantärer lymphozytärer Infiltrate bei Patienten ohne Osteolyse (Looney, Schwarz, Boyd & O'Keefe, 2006) klären.

### **5.3 Ausblick**

Bei der vorliegenden Arbeit wurden Charakteristika des Nickel-induzierten Kontaktekzems beschrieben. Die bei Spättypallergie zu beobachtenden T-Zell-Infiltrate wurden auch bei den periimplantären Gewebeproben unzementierter CrCoMo-basierter Metall-Metall-Hüftendoprothesen gefunden. Diese Befunde bilden den Ausgangspunkt für zukünftige Untersuchungen, bei denen auch funktionelle Aussagen beispielsweise anhand der Zytokinexpression periimplantärer T-Zellen bearbeitet werden. Anhand von epidemiologischen sowie klinisch-allergologischen Daten zu Patienten mit Verdacht auf Metallimplantatallergie sollen Risikokonstellationen besser erkennbar werden. Eine interdisziplinäre Stellungnahme der Fachgesellschaften zum Thema „Metallimplantatallergie“ ist zum Sommer 2007 in Aussicht gestellt.



## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden immunhistologische Charakteristika der Nickel-induzierten (Epikutantest-) Ekzemreaktion im Vergleich mit Nickel-exponierter, reaktionsloser Haut analysiert. Weiterhin wurden immunhistologische Untersuchungen an bei Revisionsoperationen erhaltenen Gewebeproben aus der Umgebung nicht-zementierter CrCOMo-basierter Hüftendoprothesen durchgeführt. Die Analysen wurden aus 10 Biopsien aus Nicketepikutantestarealen (5 Personen mit, 5 Personen ohne Nickelallergie) und an 6 periimplantären Gewebeproben durchgeführt.

Für Nickel-allergische Personen (Ekzem im Testfeld) waren im Vergleich mit Nickel-exponierter, klinisch reaktionsloser Haut deutliche Infiltrate CD3+ T-Lymphozyten mit überwiegend CD4+ Zellen sichtbar. Das entzündliche Infiltrat wurde anhand der Expression von IL-2-Rezeptor und CD69 (als früher Aktivierungsmarker) als Hinweis auf aktivierte bzw. dem Wachstumsfaktor IL-2 empfindliche Zellen hinterfragt. Hier zeigte sich eine – wenn auch individuell schwankende – erhöhte Expression im Vergleich zu den nicht-allergischen Personen. Dazu passt auch die über Expression des Markers Ki-67 erkennbare, gesteigerte Proliferation innerhalb der Infiltratzellen in Gruppe 1. Daneben war die „physiologische“ proliferative Aktivität in den basalen Epidermisanschnitten erkennbar.

Bei der Untersuchung von Adhäsionsstrukturen fiel in den mit Ekzem reagierenden Nickel-Testfeldern eine vergleichsweise deutliche Expression von ICAM-1 und E-Selektin (CD62E) auf. Dem könnte die bei einer Kontaktallergie unter TH1-Dominanz vorherrschende IFN- $\gamma$ -Produktion zugrunde liegen. In einem TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -reichen Umfeld wird auch die Expression von CD40 als kostimulatorische Struktur für aktivierte T-Zellen gefördert. Eine CD40-Hochregulation war speziell in Proben der Gruppe 1 zu beobachten. Wir haben nun innerhalb der Biopsien nickelallergischer Personen auch CD45RO-tragende Zellen nachweisen können. Dies deutet auf die Anwesenheit von (Antigen-erkennenden) Memory-T-Zellen hin.

An Gewebeproben aus periimplantärem Gewebe – erhalten bei Revisionsoperationen nicht-infektiöser unzementierter CrCoMo-Hüftgelenke – wurde in unserer Arbeit gefragt, ob sich Elemente wie bei der kutanen Spättypüberempfindlichkeitsreaktion auf Nickel finden lassen. Auch wenn diese Gewebe verschiedenen Legierungsmetallen und Partikeln noch dazu über Jahre hinweg exponiert waren, so fanden sich auch hier individuell schwankend: CD3+ Lymphozyten, meist CD4-dominiert; Hochregulation von Adhäsionsmolekülen; Expression der kostimulatorischen Struktur CD40; IL-2-R+ Zellen.

Speziell im Präparat E2 waren auch deutlich CD45RO-tragende Zellen im Sinne von Memory-Zellen sichtbar. Bei diesem Patienten hatten Schmerzen, Lockerung und Ergussbildung zum Wechsel seiner Metall-Metall-Hüftendoprothese geführt.

Zusammenfassend konnten mit den beschriebenen Methoden Charakteristika des Nickel-Kontaktekzems untersucht werden. Periimplantäre Gewebe aus revidierten Metall-Metall-Hüftendoprothesen können ebenfalls wie hier beschrieben lymphozytäre Entzündungsphänomene aufweisen. Die Ergebnisse sollen Ausgangspunkt zur Untersuchung einer möglichen metallallergischen Komponente bei nicht-infektiöser Endoprothesenunverträglichkeit sein.

## **7 DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Plewig danke ich für die Erlaubnis, meine Doktorarbeit an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchführen zu können.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas meinen besonderen Dank ausdrücken dafür, dass er mir die Möglichkeit gab, auf diesem spannenden und vielversprechenden Gebiet meine Doktorarbeit anzufertigen wie auch für die außergewöhnlich gute Betreuung.

Besonders dankbar bin ich Frau Sonja Maier, Herrn Burkhard Summer und Herrn Stephan Hackenberg für Ihre freundliche und hilfsbereite fachliche wie auch menschliche Unterstützung und Hilfe.

Vielen Dank auch an die Kollegen der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der Technischen Universität München sowie der chirurgischen Abteilung des Klinikums Dachau, die uns bei der Gewinnung der Gewebeproben behilflich waren.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Stroll vom IBE im Klinikum Großhadern München für seine wertvollen fachlichen Kenntnisse bei der Auswertung.

Außerdem möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken für ihren steten motivierenden Beistand.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Agrup G. (1968). Sensitization induced by patch testing. *Br J Dermatol*, 80, 631-634.
- Akbar AN, Vukmanovic-Stejic M, Taams LS and Macallan DC. (2007). The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cells in the periphery. *Nat Rev Immunol*, 7(3), 231-7.
- Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B and Blaser K. (1998). Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest*, 102, 98 – 106.
- ASTM Book of Standards, Vol. 13. Philadelphia, ASTM 1995.
- Barceloux DG (1999a). Cobalt. *Clin Tox*, 37(2), 201-216.
- Barceloux DG (1999b). Nickel. *Clin Tox*, 37(2), 239-258.
- Barranco VP and Soloman H (1972). Eczematous dermatitis from nickel. *JAMA* 220, 1244.
- Baur W, Hönle W, Willert HG und Schuh A. (2005). Pathologische Veränderungen im umgebenden Gewebe von revidierten Metall-Metall-Gleitpaarungen. *Orthopädie*, 24, 225-233.
- Bell EB, Sparshott SM and Bunce C. (1998). CD4+ T-cell memory, CD45R subsets and the persistence of antigen – a unifying concept. *Immunol Today*, 19(2), 60-4.
- Benson MKD, Goodwin PG and Brostoff J. (1975). Metal sensitivity in patients with joint replacement arthroplasties. *Br Med J*, 15, 374-375.
- Bettelli E and Kuchroo VK. (2005). IL-12 and IL-23-induced T-Helper cell subsets: birds of the same feather flock together. *J Exp Med*, 201(2), 169-171.
- Black J, Maitin EC, Gelman H and Morris DM. (1983). Serum concentration of chromium cobalt and nickel after total hip replacement: A six month study. *Biomaterials*, 4 160-164.
- Brown SA, Farnsworth LJ, Merritt K and Crowe TD. (1988a). In vitro and in vivo metal ion release. *J Biomed Mater Res*, 22, 321-338.
- Brown SA, Merritt K, Farnsworth LJ and Crowe TD. (1988b). Biological Significance of Metal Ion Release, In *Lemons JE(ed): Quantitative Characteristics and Performance of Porous Implants*, Philadelphia, ASTM, STP953, 163-181.
- Brodner W, Grohs JG, Bitzan P, Meisinger V, Kovarik J and Kotz R. (2000). Serum cobalt and serum chromium level in 2 patients with chronic renal failure after total hip prosthesis implantation with metal-metal gliding contact. *Z. Orthop Ihre Grenzgeb*, 138, 425-429.
- Büdinger L and Hertl M. (2000). Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview. *Allergy*, 55, S. 108 -115.
- Campbell P, Mirra J, Doorn P, Mils B, Alim R and Catelas I. (2001). Histopathology of metal-on-metal hip joint tissues. In *Rieker(ed) World Tribology Forum in Arthroplasty*, 167-180.
- Casamayor-Palleja M, Khan M and MacLennan IC. (1995). A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex. *J Exp Med*, 181(4), 1293-301.
- Carlsson A, Magnussen B and Möller H. (1980). Metal sensitivity in patients with metal to plastic total hip arthroplasties. *Acta Orthop Scand*, 51, 57-62.
- Cebrian M, Yaque E, Rincon M, Lopez-Botet M, de Landazuri MO and Sanchez-Madrid F.(1988). Triggering of T-cells proliferation through AIM, an

Activation, Inducer Molecule Expressed on Activated Human Lymphocytes, *J Exp Med*, 168, 1621-1637.

- Chiba J, Rubash HE, Kim KJ and Iwaki Y. (1994). The characterization of cytokines in the interface tissue obtained from failed cementless total hip arthroplasty with and without femoral osteolysis. *Clin Orthop Relat Res*, 300, 304-312.
- Childs LM, Goater JJ, O'Keefe RJ and Schwarz EM. (2001a). Effect of anti-TNFalpha gene therapy on wear debris induced osteolysis; *J Bone Joint Surg Am*, 83A, 1789-1797.
- Childs LM, Goater JJ, O'Keefe RJ and Schwarz EM. (2001b). Efficacy of etanercept for wear debris-induced osteolysis. *J Bone Miner Res*, 16, 338-347.
- Childs LM, Paschalis EP, Xing L, Dougall WC, Anderson D, Boskey AL, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ, Boyce BF and Schwarz EM. (2002). In vivo RANK signaling blockade using the receptor activator of NF kappaB:Fc effectively prevents and ameliorates wear debris-induced osteolysis via osteoclast depletion without inhibiting osteogenesis. *J Bone Miner Res*, 17(2), 192-199.
- Clohisy JC, Teitelbaum S, Chen S, Erdmann JM and Abu-Amer Y. (2002). TNF-alpha mediates polymethylmethacrylate particle-induced NF-kappaB activation in osteoclast precursor cells. *J Orthop Res*, 20, 174-181.
- Coleman RF, Herrington J and Scales JT (1973). Concentration of wear products in hair, blood, and urine after total hip replacement. *Br Med J*, 1(5852), 527-529.
- Cramers M and Lucht U. (1977). Metal sensitivity in patients treated for tibial fractures with plates of stainless steel. *Acta Orthop Scand*, 48, 245-249.
- Crotti TN, Smith MD, Findlay DM, et al. (2004). Factors regulating osteoclast formation in human tissues adjacent to peri-implant bone loss. Expression of receptor activator NFkappaB, RANK ligand and osteoprotegerin. *Biomaterials*, 25, 565-573.
- Davies AP, Willert HG, Campbell PA, Learmonth ID and Case CP. (2005). An unusual lymphocytic perivascular infiltration in tissue around contemporary metal-on-metal joint replacements. *J Bone Joint Surg Am*, 87A, 18-27.
- Delaunay C. (2000). Second generation metal bearings in cementless primary total hip arthroplasty: rationale, French homologation and preliminary results. *Rev Chir Orthop repara-trice Appar Mot*, 8, 809-824.
- Disegi JA and Eschbach L. (2000). Stainless steel in bone surgery. *Injury*, 31(Suppl4), 2-6.
- Duchna HW, Nowack U, Merget R, Muhr G und Schultze-Werninghaus G. (1998). Prospektive Untersuchung zur Bedeutung der Kontaktsensibilisierung durch Metallimplantate. *Zentralbl Chir* 123, 1271-1276.
- Doorn PF, Mirra JM, Campbell PA and Amstutz HC. (1996). Tissue reaction to metal on metal total hip prostheses. *Clin Orthop*, 329(Suppl), 187-205.
- Ehrlich A, Kucenic M and Belsito DV. (2001). Role of Body Piercing in the Induction of Metal Allergies. *American J Contact Dermatitis*, 12, 151-155.
- Elves MW, Wilson JN and Kemp HBS. (1975). Incidence of metal sensitivity in patients with total joint replacements. *Br Med J*, 4, 376-378.
- Faria AM and Weiner HL. (2006). Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol*, 13(2-4), 143-57.
- Fritsch P(1998), *Dermatologie und Venerologie*, Springer Verlag.
- Garner L. (2004). Contact dermatitis to metals. *Dermatologic Therapy*, 17, 321-327.

- Goebeler M, Meinardus-Hager G, Roth J, Goerdts S and Sorg C. (1993). Nickel Chloride and Cobalt Chloride, Two Common Contact Sensitizers, Directly Induce Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1), and Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule (ELAM-1) by Endothelial Cells. *J Investigative Dermatology*, 100, 759-765.
- Gawkrödger DJ. (1993). Nickel sensitivity and the implantation of orthopaedic prostheses. *Contact Dermatitis*, 28, 257-259.
- Gehrke T, Sers C, Morawietz L, et al. (2003). Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand is expressed in resident and inflammatory cells in aseptic and septic prosthesis loosening. *Scand J Rheumatol*, 32, 287-294.
- Gex-Collet C, Helbling A and Pichler WJ. (2005). Multiple drug hypersensitivity – proof of multiple drug hypersensitivity by patch and lymphocyte transformation tests. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 15(4), 293-6.
- Gordon P, Buxton P, McLaren K and Aldridge R. (1996). Sensitivity to Sternotomy Wires May Cause Postoperative Pruritus. *Ann Thorac Surg*, 61, 1514-1516.
- Gillespie WJ, Henry DA, O'Connell DL, Kendrick S, Juszcak E, McInnery K and Derby L. (1996). Development of hematopoietic cancers after implantation of total joint replacement. *Clin Orthop*, 329(Suppl), 290-296.
- Glant TT, Jacobs JJ, Molnar G, Shanbhag AS, Valyon M and Galante JO. (1993). Bone resorption activity of particulate stimulated macrophages. *J Bone Miner Res*, 8, 1071-9.
- Goldring SR, Flannery MS, Petrison KK, Evins AE and Jasty MJ. (1990). Evaluation of connective tissue cell responses to orthopaedic implant materials. *Connect Tissue Res*, 24, 77-81.
- Goh CL. (1986) Prevalence of contact allergy by sex, race, and age. *Contact Dermatitis*, 14, 237-240.
- Goldring SR, Schiller AL, Roelke M, et al. (1983). The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacement and its proposed role in bone lysis. *J Bone Joint Surg Am*, 65A, 575-584.
- Goldring SR, Jasty M, Roelke MS, et al. (1986). Formation of a synovial-like membrane at the bone-cement interface. Its role in bone resorption and implant loosening after total hip replacement. *Arthritis Rheum*, 29, 836-842.
- Goodman SB, Chin RC, Chiou SS, et al. (1989). A clinical-pathologic-biochemical study of the membrane surrounding loosened and non-loosened total hip arthroplasties. *Clin Orthop Relat Res*, 244, 182-187.
- Hallab N, Merritt K and Jacobs JJ. (2001). Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg Am*, 83A, 428-436.
- Halpin DS. (1975). An unusual reaction in muscle in association with a vitallium plate; a report of possible metal hypersensitivity. *J Bone Joint Surg*, 57B, 451-453.
- Harris KH. (1995). The problem is osteolysis. *Clin Orthop Relat Res*, 311, 46-53.
- Hayashi K, Kaneko H, Kawachi S and Saida T. (1999). Allergic contact dermatitis and osteomyelitis due to sternal stainless steel wire. *Contact Dermatitis*, 41, 115-116.
- Hegewald J, Uter W, Pfahlberg A, Geier J and Schnuch A; IVDK. (2005). A multifactorial analysis of concurrent patch test reactions to nickel, cobalt and chromate. *Allergy*, 60, 372-378.

- Heine G, Schnuch A, Uter W and Worm M. (2004). Frequency of contact allergy in German children and adolescents patch tested between 1995 and 2002: results from the Information Network of Departments of Dermatology and the German Contact Dermatitis Research Group. *Contact Dermatitis*, 51, 111-117
- Hilton KR, Dorr LD, Wan Z and McPherson EJ. (1996). Contemporary total hip replacement with metal on metal articulation. *Clin Orthop*, 329(Suppl), 99-105.
- Hirakawa K, Bauer TW, Stulberg BN, et al. (1996). Characterization and comparison of wear debris from failed total hip implants of different types. *J Bone Joint Surg Am*, 78A, 1235-1243.
- Horowitz SM, Doty SB, Lane JM and Burstein AH. (1993). Studies of the mechanism by which the mechanical failure of polymethylmethacrylate leads to bone resorption. *J Bone Joint Surg Am*, 75, 802-813.
- Hughes PJ, Brown SA, Payer JH and Merritt K. (1990). The effects of heat treatments and bead size on the corrosion of porous F-75 in saline and serum. *J Biomed Mater Res*, 24, 79-94.
- Ishizaki K, Yamada A, Yoh K, Nakano T, Shimohata H, Maeda A, Fujioka Y, Morito N, Kawachi Y, Shibuya K, Otsuka F, Shibuya K, Otsuka F, Shibuya A and Takahashi S. (2007). Th1 and type 1 cytotoxic T cells dominate responses in T-bet overexpression transgenic mice that develop contact dermatitis. *J Immunol*, 178(1), 605-12.
- Inman BA, Frigola X, Dong H and Kwon ED. (2007). Costimulation, coinhibition and cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 7(1), 15-30.
- Jacobs JJ, Sumner DR and Galante JO. (1993). Mechanisms of Bone loss associated with total hip replacement. *Orthop Clin North Am*, 24, 583-590.
- Janeway CA and Travers P. (1997). *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2.Auflage.
- Jiranek WA, Machado M, Jasty M, Jevsevar D, Wolfe HJ, Goldring SR, Goldberg MJ and Harris WH. (1993). Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. Analysis with immunohistochemical techniques and in situ hybridization. *J Bone Joint Surg Am*, 75A, 863-879).
- Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc M, Blaser K and Akdis CA. (2003). IL-10 and TGF- $\beta$  cooperate in regulatory T-cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol*, 33, 1204-1214.
- Kanerva L and Förström L. (2001). Allergic nickel and chromate hand dermatitis induced by orthopaedic metal implant. *Contact Dermatitis*, 44, 103-104.
- Kastrati A, Schomig A, Dirschinger J, Mehilli J, von Welser N, Pache J, Schuhlen H, Schilling T, Schmitt C and Neumann FJ. (2000). Increased risk of restenosis after placement of gold-coated stents: results of randomized trial comparing gold-coated with uncoated steel stents in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 101(21), 2478-83.
- Keller R. (1984). *Immunologie und Immunopathologie*, Thieme, Stuttgart, 4. Auflage.
- Kolls JK and Linden A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, 21, 467-476.
- Konttinen YT, Zhao D, Beklen A, Ma G, Takagi M, Kivela-Rajamaki M, Ashammakhi N and Santavirta S. (2005). The Microenvironment around Total Hip Replacement Prostheses. *Clin Orthop Rel Res* 430, 28-38.

- Korovessis P, Petsinis G and Repanti M. (2003). Zweymueller with metal-on-metal articulation: clinical, radiological and histological analysis of short-term results. *Arch Orthop Trauma Surg*, 123, 5-11.
- Köster R, Vieluf D, Kiehn M, Sommerauer M, Kähler J, Baldus S, Meinertz T and Hamm C. (2000). Nickel and molybdenum contact allergies in patients with coronary in-stent restenosis. *The Lancet*, 356, 1895-1897.
- Kriebich DN, Moran CG, Delves HT, Owen TD and Pinder IM. (1996). Systemic release of cobalt and chromium after uncemented total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br*, 78, 18-21.
- Kubba R, Taylor J and Marks K. (1981). Cutaneous Complications of Orthopaedic Implants. *Arch Dermatol*, 117, 554-560.
- Looney RJ, Schwarz EW, Boyd A and O'Keefe RJ (2006). Periprosthetic osteolysis: an immunologist's update. *Current Opinion in Rheumatology*, 18, 80-87.
- Margevicius KJ, Bauer TW, McMahon JT, et al. (1994). Isolation and characterization of debris in membranes around total joint prostheses. *J Bone Joint Surg Am*, 76A, 1664-1675.
- Marti A. (2000). Cobalt-base alloys used in bone surgery. *Injury*, 31(Suppl 4), 18-21.
- Masse A, Bosetti M, Buratti C, Visentin O, Bergadano D and Cannas M. (2003). Ion release and chromosomal damage from total hip prosthesis with metal-on-metal articulation. *J Biomed Mater Res*, 67, 750-757.
- Mayor MB, Merritt K and Brown SA. (1980). Metal allergy and the surgical patient. *Am J Surg*, 139, 477-479.
- McDonald SJ, McCalden RW, Chess DG, Bourne RB, Rorabeck CH, Cleland D and Leung F. (2003). Metal-on-metal versus polyethylene in hip arthroplasty: a randomized clinical trial. *Clin Orthop*, 406, 282-296.
- McKellop H, Park SH, Chiesa R, Doorn P, Lu B, Normand P, Grigoris P and Amstutz H. (1996). In vivo wear of three types of metal on metal hip prostheses during two decades of use. *Clin Orthop*, 329(Suppl), 128-140.
- McKenzie AW, Aitken CV and Risdill-Smith R. (1967). Urticaria after insertion of Smith-Petersen Vitallium nail. *Br Med J*, 4, 36.
- Menné T and Nieboer E. (1989). Metal contact dermatitis: A common and potentially debilitating disease. *Endeavour*, 12, 117-122.
- Merkel KD, Erdmann JM, McHugh KP, Abu-Amer Y, Ross FP and Teitelbaum SL. (1999). TNF-alpha mediates orthopaedic implant osteolysis. *Am J Pathology*, 154, 203-210.
- Merritt K and Brown SA. (1980). Tissue reaction and metal sensitivity. An animal study. *Acta Orthop Scand*, 51, 403-411
- Merritt K and Brown SA. (1981). Metal sensitivity reactions to orthopaedic implants. *Int J Dermatol*, 20, 89-94
- Merritt K, Brown SA and Sharkey NA. (1984). The binding of metal salts and corrosion products to cells and proteins in vitro. *J Biomed Mater Res*, 18, 1005-1015.
- Merritt K and Brown SA. (1993). Effects of metal particles and ions on the biological system. *Techniques Orthop*, 8, 228-236
- Merritt K and Brown S. (1996). Distribution of Cobalt Chromium Wear and Corrosion Products and Biologic Reactions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 329S, 233-243.



- Merritt K and Rodrigo JJ. (1996). Immune response to synthetic materials. Sensitization of patients receiving orthopaedic implants. *Clin Orthop*, 326, 71-79.
- Miossec P. (2003). Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T-cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. *Arthritis Rheum*, 48, 594-601.
- Moed H, Boorsma DM, Stoof TJ, von Blomberg BM, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Gibbs S and Rustemeyer T. (2004). Nickel-responding T cells are CD4+ CLA+ CD45RO+ and express chemokine receptors CXCR3, CCR4 and CCR10. *Br J Dermatol*, 151(1), 32-41.
- Munro-Ashman D and Miller AJ. (1979). Rejection of metal to metal prostheses and skin sensitivity to cobalt. *Contact Dermatitis*, 2, 65-67.
- Park YS, Moon YW, Lim SJ, Yang JM, Ahn G and Choi YL. (2005). Early osteolysis following second-generation metal-on-metal hip replacement. *J Bone Joint Surg Am*, 87A, 1515-1521.
- Rakoski J, Mayenburg J, Döngemann H und Borelli S. (1986). Metallallergien bei Patienten mit Metallimplantaten im Knochen. *Allergologie*, 4, 160-163.
- Robert C and Kupper TS. (1999). Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N Engl J Med*, 341(24), 1817-28.
- Rodgers K, Klykken P, Jakobs J, Frondoza C, Tomazic V and Zelikoff J. (1997). Immunotoxicity of medical devices. *Fundam Appl Toxicol*, 36, 1-14.
- Roitt IM. (1994). *Essential Immunology*, Blackwell, London. 8th edition.
- Roitt IM, Brostoff J and Male DK. (1995). *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*, Thieme, Stuttgart, 3.Auflage
- Samitz MH and Katz SA (1975). Nickel dermatitis hazards from prostheses. *British Journal of Dermatology*, 92, 287-290.
- Santavirta S, Konttinen YT, Hoikka V and Esola A. (1991). Immunopathological response to loose cementless acetabular components. *J Bone Joint Surg Br*, 73, 38-42.
- Schafer T, Bohler E, Ruhdorfer S, Weigl L, Wessner D, Filipiak B, Wichmann HE and Ring J. (2001). Epidemiology of contact allergy in adults. *Allergy*, 56(12), 1192-1196.
- Schaffer AW, Pilger A, Engelhardt C, Zweymueller K and Ruediger HW. (1999). Increased blood cobalt and chromium after total hips replacement. *J Toxicol Clin Toxicol*, 37, 839-844.
- Schnuch A, Geier J, Lessmann H, Uter W, Brasch J und Frosch P. (2004) Kontaktallergene im aktuellen Zeitverlauf. *Allergo J*, 13: 57-69.
- Schwartz R. (2003). T cell anergy. *Annu Rev Immunol*, 21, 305 - 334.
- Schwarz EM, Lu AP, Goater JJ, Benz EB, Kollias G, Rosier RN, Puzas JE and O'Keefe RJ. (2000). TNF-alpha/nuclear transcription factor kappaB signaling in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res*, 18, 472-480.
- Schwarz EM, Looney RJ and O'Keefe RJ. (2000). Anti-TNF-alpha therapy as a clinical intervention for periprosthetic osteolysis. *Arthritis Res*, 2: 165-168
- Semlitsch M, Streicher RM und Weber H. (1989) Verschleißverhalten von Pfannen und Kugeln aus CrCoMo-Gußlegierungen bei Langzeit-implantierten Ganzmetall-Hüftendoprothesen. *Orthopädie*, 18, 377-381.
- Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO and Glant TT. (1995). Cellular mediators secreted by interfacial membranes obtained at revision total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*, 10, 498-506.
- Sieber HP, Rieker CB and Kottig P. (1999). Analysis of 118 second-generation metal-on-metal retrieved hip plants. *J Bone Joint Surg Br*, 81, 46-50.

- Steinemann SG. (1980). Corrosion of Surgical Implants - In Vivo and In Vitro Tests. In *Winter GD (ed) Evaluation of Biomaterials New York, John Wiley*, 1-34.
- Sunderman FW Jr, Hopfer SM, Swift T, Rezuze WN, Ziebka L, Highman P, Edwards B, Folcik M and Gossling HR. (1989). Cobalt, chromium and nickel concentrations in body fluids of patients with porous-coated knee or hip prostheses. *J Orthop Res*, 7, 307-315.
- Takayanagi H., Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K and Taniguchi T. (2000). T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*, 408, 600-605.
- Taki N, Tatro JM, Nalepka JL, Togawa D, Goldberg VM, Rimnac CM and Greenfield EM. (2005). Polyethylene and titanium particles induce osteolysis by similar, lymphocyte-independent, mechanisms. *J Orthop Res*, 23, 376-383
- Testi R, Phillips JK and Lanier LL. (1989). T cell activation via Leu-23(CD69). *J Immunol*, 143(4), 1123-1128.
- Thierse HJ, Moulon C, Allespach Y, Zimmermann B, Doetze A, Kuppig S, Wild D, Herberg F und Weltzien HU. (2004), Metal- Protein Complex-Mediated Transport and Delivery of Ni<sup>2+</sup> to TCR/MHC contact Sites in Nickel-Specific Human T Cell Activation. *J Immunol*, 172, 1926 – 1934.
- Thierse HJ, Gamberdinger K, Junkes C, Guerreiro N, Weltzien HU. (2005), T cell receptor interaction with haptens: metal ions as non-classical haptens. *Toxicology*, 209, 101 – 107.
- Thomas P, Barnstorf S und Summer B. Allergologische Aspekte der Bioverträglichkeit von Titanbasisimplantaten. III. Statusbericht Forbiomat
- Thomas P. (2003). Allergien durch Implantatwerkstoffe, *Orthopädie*, 32, 60-64.
- Urban R, Jacobs J, Tomlinson M, Gavrilovic J, Black J and Peoc'h M. (2000). Dissemination of Wear Particles to the Liver, Spleen, and Abdominal Lymph Nodes of Patients with Hip or Knee Replacement. *J Bone Joint Surg*, 82-A, 457-476.
- Vernon-Roberts B and Freeman MAR. (1976). Morphological and analytic studies of the tissues adjacent to joint prostheses: investigation into causes of loosening of prostheses. In *Schaldach M, Hohmann D (eds): Engineering in medicine, vol.1. Advances in artificial hip and knee joint technology*. Springer, Stuttgart, 148-186.
- Visuri T, Pukkala E, Paavolainen P, Pulkkinen P and Riska EB. (1996). Cancer risk after metal on metal and polyethylene on metal total hip arthroplasty. *Clin Orthop* 329 (Suppl), 280-289.
- Waterman AH and Schrik JJ. (1985). Allergy in hip arthroplasty. *Contact Dermatitis*, 13, 294-301.
- Weber BG. (1996). Experience with the metasul total hip bearing system. *Clin Orthop*, 329, 69-77.
- Weiss JM, Renkl AC und Simon JC. (2003). Zellmigrations- und adhäsionsprozesse bei Immunreaktionen vom Spättyp. *Allergo J*, 12, 133-136.
- Werfel T, Hentschel M, Kapp A and Renz H. (1997). Dichotomy of Blood- and Skin-Derived IL-4-Producing Allergen-Specific T-Cells and Restricted V $\beta$  Repertoire in Nickel-Mediated Contact Dermatitis. *J Immunol*, 158, 2500 – 2502.
- Willert HG, Buchhorn A, Fayazzi A und Lohmann C. (2000). Histopathologische Veränderungen bei Metall/Metall- Gelenken geben

Hinweise auf eine zellulär vermittelte Überempfindlichkeit. *Osteologie*, 9, 165-179.

- Willert HG, Buchhorn A, Fayazzi A and Lohmann C. (2001). Histopathological changes in tissues surrounding metal/metal joints-signs of delayed type of hypersensitivity?(DTH) In: *Rieker (ed) World Tribology Forum in Arthroplasty*, 167-180.
- Willert HG and Semlitsch M. (1996). Tissue Reactions to Plastic and Metallic Wear Products of Joint Endoprotheses. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 333, 4-14.
- Willert HG, Buchhorn GH, Fayyazi, Flury R, Windler M, Koster G and Lohmann CH. (2005). Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints. A clinical and histomorphological study. *J Bone Joint Surg Am*, 87, 28-36.
- Yang J and Black J. (1994). Competitive binding of chromium, cobalt and nickel to serum proteins. *Biomaterials*, 15, 262-268.

## 9 LEBENS LAUF

Name:	Schöberl
Vorname:	Anja
Geburtsdatum / -ort:	04.05.1979, Ingolstadt
Adresse:	Marquardsenstr.12, 91054 Erlangen
Eltern:	Horst Schöberl, Studiendirektor a. D. Gertraud Schöberl, geb. Mayer, Oberstudienrätin
Persönliche Verhältnisse:	ledig

### **Schulbildung**

1985 – 1989	Grundschule Haunwöhr, Ingolstadt
1989 – 1998	Apian-Gymnasium, Ingolstadt (Abitur: 1,0)
06/1998	Stipendium der bayerischen Begabtenförderung

### **Hochschulbildung**

1998 - 2005	Studium der Humanmedizin an der LMU, München (Abschlussnote: 1,99)
-------------	--

### **Berufstätigkeit**

Seit 10/2005	Assistenzärztin an der Medizinischen Klinik 1, Uniklinikum Erlangen
--------------	---